No. 75 September 1957

BULLETIN OF NATIONAL HYGIENIC LABORATORY

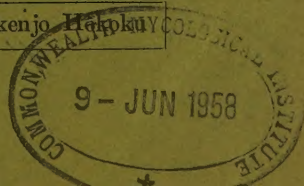
Tamagawa Yoga-Machi, Setagaya-Ku, Tokyo, Japan.

衛生試験所報告

第75号

昭和32年9月

国立衛生試験所

衛生試報

Eisei Shikenjo Hokoku

BULLETIN

OF

NATIONAL HYGIENIC LABORATORY

Tamagawa Yoga-Machi, Setagaya-Ku, Tokyo, Japan

衛生試験所報告

第75号

[illegible]

国立衛生試験所

BULLETIN
OF
NATIONAL HYGIENIC LABORATORY

Tamagawa Yoga-Machi, Setagaya-Ku, Tokyo, Japan.

衛生試験所報告

第75号

昭和32年9月

国立衛生試験所

目　次

報　文

資　　料

速　　報

業 務 報 告

CONTENTS

パラアミノサリチル酸カルシウム顆粒中のカルシウムの定量

板井孝信，菅沼義夫

On the Assay-method of Calcium in Calcium *Para*-Aminosalicylate Granules JNF Ⅱ.

Takanobu Itai and Yoshio Suganuma

昨冬公布の国民医薬品集追補2の中のパラアミノサリチル酸カルシウム顆粒におけるカルシウム定量法は原末のそれと少しちがつている．当時この追試を行つて見たが大した差異もないので原案のままとなつた．そのとき代表メーカー5社7検体を集めたので，これについて四酢酸エチレンジアミン二ナトリウム液を用いてもカルシウムの定量を試み，2つの結果を対照して見た．以下そのときのデータを掲げて参考に供する．

（Ⅰ）酸化法

(1) パラアミノサリチル酸カルシウム（ＪＮＦⅡ）の定量法

本品約200mgを精密に秤り，塩化アンモニウム試液5cc及び水10ccを加え加熱して溶かし[1]，かきまぜながら蓚酸アンモニウム試液10ccを加え水浴上で1時間加熱する．ここに生じた沈澱を濾過し，洗液が塩化カルシウム試液で1分間以内に濁りを生じなくなるまで熱湯で洗い，次に濾紙の底に穴をあけ，熱湯100ccを用いてビーカ中に流し込み，うすめた硫酸（1：3）30ccを加え[2]，80°に加熱し，N/10過マンガン酸カリウム液で滴定する．[3]

1) 液がわずかに黄褐色を呈するまで加熱しても痕跡程度の不溶分を残すが，液は澄明となる．

2) うすめた硫酸を濾紙上に注ぎ流し込む．

3) 同時に空試験を行つたが，N/10過マンガン酸カリウム液0.05ccで1分間紅色を保つた．

結果：検体：A，15.92，16.39，16.60，16.63，16.74%，平均 16.45%

別に検体B～Gについて行つた結果は表2に掲げた．

(2) 本品約200mgを精密に秤り，塩化アンモニウム試液5cc及び水10ccを加え，50°の水浴中に加温して大部分を溶かし，[1] 濾過し，[2] 濾紙を温湯3ccずつで5回洗い，[3] 洗液を濾液に合し．蓚酸アンモニウム試液10ccを加えて沸騰水浴上で1時間加熱する．以下(1)に同じ．

1) 不溶分は(1)と同程度，液はわずかに乳濁する．

2) 東洋濾紙No. 4を用いたが乳濁は除去できなかつた．

3) 最後の洗液は蓚酸アンモニウム試液で1分間以内には濁らない．

結果：検体： A，15,91，16.27，16.45，16.57，16.59%，平均16.35%

(3) パラアミノサリチル酸カルシウム顆粒（ＪＮＦⅡ）の定量法．本品を粉末とし，パラアミノサリチル酸カルシウム約200mgに対応する量を精密に秤り，水100ccを加えて水浴で加温し，稀塩酸0.5～2.0ccを加えて溶かし，アンモニア試液で中和した後，[1] かきまぜながら熱蓚酸アンモニウム試液10ccを加える．この混液を水浴上で1時間加熱して濾過し，沈澱を温湯少量ずつを用いて洗い，洗液に塩化カルシウム試液を加えても1分間以内に混濁を生じなくなつたとき，濾紙上の沈澱をまず熱湯で，次にうすめた硫酸（1：3）30ccでビーカに流し込み，この液を80°に加温し，N/10過マンガン酸カリウム液で滴定する．

1) 温時中和すると白濁を生じるので冷時加えるのがよい．又アンモニアを加えてアルカリ性にすると白濁を生じやすいので避ける方がよい．

結果： 検体： A，15.91，15.98，16.03%，平均 15.97%

（Ⅱ）四酢酸エチレンジアミンニナトリウム法

(1) 本品約1gを精密に秤り，水10cc及び過塩素酸10ccを加え熱板上で静かに加熱し，溶液を蒸発乾固する．冷後 塩酸（1：1）3cc及び水を加えて溶かし，全量を正確に250ccとする．この液10ccを正確に量り，水40cc及び水酸化カリウム液（1：5）2ccを加え[1] 更にムレキサイド試薬25mgを加え[2]，かきまぜながらN/50四酢酸エチレンジアミン液で紅色が紫色を呈するまで[3] 滴定する．

N/50四酢酸エチレンジアミン液1cc＝0.8016mgCa

1) アルカリ性として長く放置すると浮遊沈澱を生じ，四酢酸エチレンジアミン液の消費量を減ずる.

2) ムレキサイドの色も放置すると退色するので早く滴定することが望ましい. 滴定の直前に加えればよい.

3) 対照液にN/10過マンガン酸カリウム液4滴を水100ccに加えた液を用いると終末点の判定が楽である.

結果： 検体：A, 15.76, 15.79%, 平均15.78%.

(2) 本品約1gを精密に秤り，塩化アンモニウム試液70ccを加え，水浴上ですみやかに溶かし,[1] 冷後 水を加えて正確に250ccとし，以下 (1)法の「この液10ccを正確に量り……」以下を行う.

1) 着色を避けるため，なるべく低温，かつ最少時間で加温して溶解する. 結果：表1

Table 1. Results of the determination of Calcium in Calcium Paraaminosalicylate by the titration with disodium ethylenediaminetetraacetate

Sample	No.	Weight of sample in 1,000cc	Volume of N/50 EDTA				Calcium	
			1	2	3	Average	found	average
A	1	1,031.1mg	15.15cc	15.05cc	15.05cc	15.08cc	15.69%	15.73%
	2	1,021.1	16.25	16.30	16.35	16.30	15.86	
	3	1,029.5	14.95	15.10	15.10	15.05	15.68	
	4	1,021.7	15.00	14.95	14.85	14.93	15.67	
B	1	1,027.7	14.60	14.50	14.70	14.60	15.57	
C	1	998.6	14.35	14.30	14.40	14.35	15.75	
D	1	1,030.1	14.90	14.55	14.90	14.78	15.73	15.77
	2	1,026.1	15.05	15.05	14.95	15.01	15.69	
	3	1,004.8	15.00	15.00	14.95	14.98	15.99	
	4	1,015.6	14.90	14.80	14.80	14.83	15.66	
	5	1,032.6	15.25	15.20	15.20	15.21	15.80	
E	1	1,035.7	15.15	14.95	15.05	15.05	15.92	15.99
	2	975.1	14.30	14.60	14.65	14.51	15.96	
	3	980.2	14.75	14.85	14.80	14.80	16.20	
	4	970.9	14.60	14.20	14.40	14.40	15.91	
	5	962.7	14.40	14.30	14.25	14.31	15.94	
F	1	1,030.0	14.90	15.00	—	14.95	15.91	15.86
	2	1,000.5	15.00	14.55	14.40	14.65	15.75	
	3	1,004.3	14.65	14.70	14.70	14.68	15.73	
	4	1,005.7	14.95	14.90	15.00	14.95	15.99	
	5	1,002.4	14.80	14.85	14.85	14.83	15.92	
G	1	1,009.0	14.25	14.25	14.20	14.23	15.46	15.62
	2	1,056.3	15.50	15.50	15.60	15.53	15.82	
	3	1,055.3	15.20	15.30	15.30	15.26	15.56	
	4	1,055.5	15.40	15.45	15.40	15.41	15.71	
	5	1,008.6	14.60	14.60	14.60	14.60	15.57	

Table 2. The comparison of the results by the method in Calcium Paraaminosalicylate （J N F Ⅱ） and by the method with EDTA

Sample	Methods	
	the method in Ca-PAS JNF Ⅱ	the method with EDTA
A	16.45%	15.73%
B	15.92	15.57
C	15.85	15.75
D	16.05	15.77
E	16.57	15.99
F	16.15	15.86
G	16.04	15.62

酸化法の(1)，(2)，(3)は原理的に見ればほとんど差異がないものであるが，(1)，(2)，(3)の順に低い値を示し，ことに(1)と(3)は差があるがこの原因は目下不明である.

又，四酢酸エチレンジアミンニナトリウム法，(1)と(2)は検体を灰化するか否かの差異があるが，定量値にはちがいが認められないこの定量値は（Ⅰ）に比してやや低いが，（Ⅱ）(2) 法は簡単で行いやすいのでよい方法と思う.

Summary

The assay methods of calcium in Calcium Paraaminosalicylate (J. N. F. Ⅱ) and its Granules (J. N. F. Ⅱ)are a little different from each other. The both methods were examined Calcium Paraaminosalicylate Granules as samples. The values gained by former method were higher than by the latter, though the difference was about 0.5%.

Beside, we studied the procedure with disodium salt of ethylenediamine tetraacetic acid. The values by this were lower than the one by the above-mentioned first method, the difference was 0.23% in average. This seems usable. The detail is as follows.

Accurately weigh about 1 Gm. of Calcium Paraaminosalicylate Granules, add 7 cc. of ammonium chloride T. S., dissolve it by warming on a water-bath as fast as possible. After cooling, add water to 250 cc. Accurately take 10 cc. of this solution, add 40 cc. of water, 2 cc. of pottasium hydroxid solution (1 : 5), and murexide as an indicator. Titrate with fifties normal disodium salt of ethylenediamine tetraacetic acid until red color changes to slightly purple.

One cc. of fifties normal disodium salt of ethylenediamine tetraacetic acid is equivalent to 0.8016 mg. Ca.

Received June 18, 1957

^{60}Co照射によるホルモン剤の殺菌に関する研究

長沢佳熊，中山豪一，芹沢　淳，佐藤　浩，白井浄二

Studies on the Sterilization of Hormone Preparations through Radiation of ^{60}Co.

Kakuma NAGASAWA, Goichi NAKAYAMA, Jun SERIZAWA,
Hiroshi SATO and Joji SHIRAI

市販脳下垂体後葉注射液及びインシュリン注射液に^{60}Coを照射し，照射前後のそれらの注射液の成分の力価を検定し，照射量との関係を調査し，一方当所細菌部（部長岩原繁雄博士）で行われた菌数試験と対照して，それら注射液の無菌性を考察し，^{60}Co照射の滅菌法としての価値を検討した．脳下垂体後葉注射液では6.5万r*の照射により力価の減少は全く認めなかつたが，45.7万rの照射によりオキシトシン単位は約56%，バソプレシン単位は約42.3%に減少した（実験1）．インシュリン注射液では5.4万rの照射により力価の減少は認められなかつたが，45.7万rの照射により約22.5%の力価の減少を認めた（実験2）．

当所細菌部の実験によれば，40%ブドウ糖注射液（菌数：数万個含有）に^{60}Co 33万rを照射すると，菌数が1/1 000に減少することを認めているから，これら両注射液の滅菌に対する^{60}Coの照射は有望と考えられる．

実験方法

^{60}Coの照射：国立第2病院放射線科の厚意により^{60}Co治療室で行つた．その際脳下垂体後葉注射液（10単位/cc）は0.5ccアンプル入りのものをビニール袋に入れて照射し，インシュリン注射液（40単位/cc）はできるだけ無菌的に注射筒を用いてバイアル瓶から1ccアンプルに充塡し，ビニール袋に入れて照射した．

力価の定量法：脳下垂体後葉注射液についてはニワトリ血圧下降法[1]によりオキシトシン単位を測定し，脳髄破壊白鼠法[2,3]によりバソプレシン単位を測定した．又インシュリン注射液については未照射注射液を対照として家兎血糖降下法[1]により単位を測定した．

実験結果

〔実験1〕 a) ^{60}Co照射前後の脳下垂体後葉注射液の力価の変動：体重1.7～2.0kgの健康な白色レグホン雄ニワトリを用い，^{60}Coの照射量と日局脳下垂体後葉注射液の定量法に準拠した力価の変動を調べ，Table 1の結果を得た．

Table 1. Variation of Potency of Posterior Pituitary Injection before and after ^{60}Co Radiation

Radiation dose (r)	Oxytocin unit per cc	Percentage against control (%)	Fiducial limits of error(%) 〔P=0.95〕
16 300	10.5	106.1	82.5～124.4
65 200	10.1	102.0	87.6～114.2
456 900	4.4	44.4	86.4～118.1
Control	9.9	100.0	86.9～114.8

Table 1から16 300，65 200 rの照射ではそれぞれ力価が6及び2%増大したが，これは生物学的検定の誤差範囲に入るので，力価の変動があつたとは認め得ない．次に456 900 rの照射では力価の減少は55.6%に及んだ．これは明らかに照射による影響と考えられる．

b) ^{60}Co照射前後の脳下垂体後葉注射液中のバソプレシン力価の変動：体重355 gの健康な雄白鼠の脳髄を破壊し，国薬Ⅱバソプレシン注射液の定量法に準拠した力価の変動と^{60}Coの照射量との関係を調べた．ただしa)で行つたオキシトシン成分の力価の変動から推測して65 200 rの照射による力価は予め試験的に1－1検定を行

* rはレントゲン

い，何らの力価の減少を認めなかつたので，456 900 r の照射による力価の減少のみを定量した． その結果をTable 2に示す．

Table 2. Variation of Vasopressin Potency of Posterior Pituitary Injection before and after ^{60}Co Radiation

Radiation dose (r)	Vasopressin unit per cc	Percentage against control (%)	Fiducial limits of error (%) [P=0.95]
16 300	9.8*	92.5	89.5～111.5
456 900	2.8**	42.3	83.1～125.1

* Unit of Control Posterior Pituitary Injection : 10.6 u.

** Unit of Control Posterior Pituitary Injection : 6.5 u.

Table 2から 16 300 r の照射では力価の減少は殆んど認められないが，456 900 r の照射では 57.7% の減少を見た．

〔実験2〕 ^{60}Co 照射前後のインシュリン注射液の力価の変動：体重 2.05～2.55 kgの健康な家兎を用い，対照として未照射インシュリン (40単位/cc) を使用して Marks法[4] に準拠して ^{60}Co の照射量と力価の変動を調べTable 3 に示す．

Table 3. Variation of Potency of Insulin Injection before and after ^{60}Co Radiation

Radiation dose (r)	Unit per cc	Percentage against control %
5 400	37	92
456 900	31	77

Table 1 から5 400 r の照射では約 7.5% の力価の減少を示しているが，この程度の減少は今回実施した生物学的検定法では，その誤差範囲内に入るので，力価の減少を認め得ない． 次に 456 900 r の照射では約 23 %の減少を示す．これは明らかに照射による影響と考えられる．

むすび 以上市販脳下垂体後葉注射液及びインシュリン注射液に ^{60}Co を照射した結果，両注射液とも 45.7万 r の照射により力価の減少を来たしたが，前者の方がはるかに著しい減少を示した．

終りに^{60} Co 照射の労をとられた当所細菌部来栖技官および，照射に便宜を与えられた国立第二病院放射線科 ^{60}Co治療室の方々に感謝する．

文献

1) 日局Ⅵ； 追補 6, 8頁.
2) 国薬Ⅱ， 追補 2, 8頁.
3) 中山豪一； 衛試, 74, 141, (1956).
4) Marks, H. P. : The Health Organization of the League of the Nations 1926, Biological Standardization of insulin, 57.

Summary

After 65 000 rentgen radiation through ^{60}Co, the posterior pituitary injection lost no activity and after 456 900 rentgen, about 56% its potency in oxytocin unit and 58% its potency in vasopressin unit.

After 5 400 rentgen radiation by ^{60}Co, the insulin injection lost no activity and after 456 900 rentgen, about 23% activity.

Received June 18, 1957

^{65}Znの組織への沈着に関する研究

長沢佳熊，中山豪一，城戸靖雅，亀谷勝昭

Studies on the Deposition of ^{65}Zn in the Tissue

Kakuma NAGASAWA, Goichi NAKAYAMA, Yasumasa KIDO, Katsuaki KAMETANI

まえがき　Znの生体内での生化学的役割は，特殊のものであるらしいが，まだはっきりしていない．近年これに関する研究はきわめて多い．殊にZnが膵臓中にかなり多量に含まれ（Fisher, Scott)[1]，膵臓ホルモンのインシュリンがZnと結合して結晶化することや，持続性インシュリンとして使われる結晶性アイソフェンインシュリンなどのZnの意義，さらに岡本[2]によるとランゲルハンス組織はZnとの結合試薬ジチゾンなどの作用を受け，その β 細胞が変化し，糖尿病を起すといわれた．又Weitzel, Fretzdorf[3]は，Znは膵臓のみならずその他の組織にもかなり多量含まれていることを報告し，細胞代謝に関与するヒスチジン及びその誘導体並びにプリン体との錯塩として体内で重要な役割を演じていると報告している．これらZnの生体内における沈着部位に関して，Montgomery等[4]，Sheline等[5]，Birnstingel等[6]及びTaylor等[7]によると，実験動物に注射した ^{65}Zn は膵液や胆汁中に混じて排出されるといわれ，最近は特に前立腺中葉への沈着が強いと報告されている．

著者等は白鼠の尾静脈から ^{65}Zn 0.4 mc./kg を注射し，その体内分布，尿及び糞中への排出を調べた．注射後第6日の前立腺中葉は他腺に比べて著しく強い放射能 48 647 c.p.m.*（0.1024 μc.）を示した．注射後第20日までにすべての腺の放射能は 4 000 c.p.m.（0.0084 μc.）内に減少した（Table 2, Fig. 1）．尿中への排出は24時間尿を用いて測定し，注射後24時間で最高に達し，以後はきわめて徐々に減少することを知つた（Table 3, Fig. 2）．又糞中への排出は注射後第3日で最高に達し，第7日まで急激に減少し，以後は徐々に減じ，第33日では 10 000 c.p.m.（0.0210μc.）以下になつた（Table 4, Fig. 3）．

実験操作　(1) $^{65}ZnCl_2$ 注射液の調製法：原液（$^{65}ZnCl_2$の塩酸溶液）を 0.85% 塩化ナトリウム液で稀め，0.00088% 水酸化ナトリウム液を加えてpH 7とした．本液1cc当りの放射能は 9 393 500 c.p.m.（19.7675 μc.）である．(2) 試験動物，注射量及びカウント数：体重 123～173 gの白鼠の体重1g 当り$^{65}ZnCl_2$溶液0.002 cc（=187 870 c.p.m. =0.3953μc.）を尾静脈内に注射した．Table 1に白鼠体重，性別，注射量及び注射カウント数を示す．

Table 1. Body weight and sex of the rats used, and dose and its radioactivity of ^{65}Zn injected.

Group No.	Rat No.	Sex	Body weight (g)	Injection dose (cc)	Injection count (c.p.m.)
I	1	♀	157	0.314	2 949 559
	2	♀	162	0.324	3 043 494
II	3	♀	123	0.246	2 310 801
	4	♀	148	0.296	2 780 476
III	5	♀	159	0.318	2 987 133
	6	♀	173	0.346	3 250 151
IV	7	♀	135	0.270	2 536 245
	8	♀	151	0.302	2 836 837
V	9	♂	150	0.300	2 818 050
	10	♂	166	0.332	3 118 642
VI	11	♂	152	0.304	2 855 624
	12	♂	157	0.314	2 949 559
VII	13	♂	158	0.316	2 968 346

* 1分間当りのカウント数

(3) 組織の処理：摘出組織を磁製ルツボに入れ，まず直火で乾燥し，炭化し，次いで濃硝酸及び濃硫酸各少量ずつをときどき滴加し，完全に灰化し，デシケータ（硫酸）中に放冷した後，ルツボ内容物に濃硝酸約 2 cc を加え，水浴上で蒸発乾固し，得た灰分（硝酸塩）を熱水に溶かし，重量既知の試料皿に移し，赤外線ランプ下で蒸発乾固し，秤量した後，放射能を測定する．(4) 採尿，糞及びその処理：24時間の尿又は糞をルツボに集め，水浴上で蒸発乾固し，組織の処理に準拠して灰化し，放射能を測定する．(5) 放射能の測定：科研 32 進型 Scaler を使用し，距離 1 cm で 5 分間測定する．効率は 21.54～21.66％（標準品 N. B. S. 製 RaD, E. No. 2611, 197 dis/sec., July 1, 1954・背面散乱を補正しない効率である．これを補正するとステンレス製試料皿を使つているので 14.36～14.44％となる）．得た測定値につき次式[3]により同時計数を補正する．$N=n/(1-nT)$，ただし N は同時計数を補正したカウント数，n は未補正カウント数，T は分解時間で本実験では 0.00001514 である．次に注射後の各日のカウント数（N）を次式により注射直後のカウント数（N_0）に補正する．

$N_0=N/e^{-\lambda t}$，ただし e は自然対数の底，λ は ^{65}Zn の崩壊定数で 197，t は注射後の経過時間．

実験結果　(1) ^{65}Zn 投与後の体内分布：$^{65}ZnCl_2$ 注射液を注射した後，第 2，6，8，13 及び 20日に白鼠 1 匹ずつを殺し，各組織を摘出し，灰化し，それぞれの放射能を測定した．その結果を Table 2 に示す．

Table 2. The movement of radioactivity in individual organ after ^{65}Zn injection.

Name of organ	2nd day after injection				6th day after injection				8th day	
	Wet (g)	Ashed (g)	c.p.m.	c.p.m. per g	Wet (g)	Ashed (g)	c.p.m.	c.p.m. per g	Wet (g)	Ashes (g)
Brain	1.4	0.0356	4 338	3 099	—	0.3451	5 078	—	1.5	0.0387
Thymus	—	—	—	—	—	—	—	—	0.4	0.0066
Stomach	3.0	0.1111	13 210	4 403	—	—	—	—	2.5	0.1390
Intestine	—	—	—	—	—	—	—	—	14.5	0.4381
Pancreas	0.9	0.0327	18 108	20 120	—	—	—	—	0.3	0.0037
Liver	—	—	—	—	6.7	0.2082	76 913	11 480	7.4	0.1489
Lung	—	—	—	—	0.7	0.0203	8 231	11 759	0.8	0.0199
Spleen	0.3	0.0177	11 540	38 467	0.2	0.0003	35	175	0.4	0.0125
Heart	1.0	0.0198	12 405	12 405	0.7	0.0081	697	995	0.8	0.0114
Kidney	1.5	0.0480	39 478	26 319	1.2	0.0322	11 384	9 487	1.2	0.0191
Blood	—	0.0657	13 717	—	—	0.5512	345	—	—	—
Muscle	—	—	—	—	29.3	0.3635	66 477	2 269	—	—
Bone	42.4	0.2844	10 712	253	39.5	0.3518	704	704	—	—
Teeth	1.0	0.1552	2 283	2 283	—	0.1174	317	—	—	—
Testis	3.9	0.0559	21 194	54 344	2.7	0.0182	8 985	3 328	—	—
Prostate	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
cranial	—	—	—	—	0.051	0.0009	946	18 549	—	—
dorsolateral	—	—	—	—	0.017	0.0016	827	48 647	—	—
ventral	—	—	—	—	0.111	0.0019	467	42 455	—	0.0056
Seminal vesicle	—	—	—	—	0.190	0.0018	647	3 405	—	—
Ovary	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Tail	—	—	—	—	—	0.1781	6 772	—	—	—

Name of organ	after injection		13th day after injection				20th day after injection			
	c.p.m.	c.p.m. per g	Wet (g)	Ashed (g)	c.p.m.	c.p.m. per g	Wet (g)	Ashed (g)	c.p.m.	c.p.m. per g
Brain	5 209	3 473	1.5	0.0341	6 383	4 255	1.5	0.0367	3 494	2 329
Thymus	1 845	4 613	0.5	0.0144	2 524	5 048	0.2	0.0030	414	2 070
Stomach	8 940	3 576	2.3	0.0495	7 256	3 155	2.3	0.0542	3 656	1 590
Intestine	41 198	2 841	13.3	0.1829	11 374	855	11.7	0.0692	7 438	626
Pancreas	535	1 783	—	—	—	—	0.2	0.0062	659	3 295
Liver	90 912	12 285	—	—	—	—	3.8	0.0774	10 379	3 243
Lung	6 275	7 844	—	—	—	—	0.8	0.0171	1 918	2 398
Spleen	4 591	11 478	0.1	0.0114	1 555	15 550	0.4	0.0043	475	1 188
Heart	4 875	6 094	0.8	0.0156	3 526	4 408	0.5	0.0072	1 286	2 572
Kidney	6 350	5 292	—	—	—	—	0.9	0.0216	2 311	2 568
Blood	—	—	—	0.0491	5 465	—	4.0	0.0485	3 009	752
Muscle	—	—	48.5	0.4525	6 787	6 787	53.3	0.5183	20 028	1 728
Bone	—	—	—	0.1942	1 908	—	—	0.2303	4 909	92
Teeth	—	—	—	—	—	—	—	—	1 965	—
Testis	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Prostate	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
cranial	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
dorsolateral	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ventral	2 000	—	—	—	—	—	0.2	—	—	—
Seminal vesicle	—	—	—	0.3354	9 323	—	1.9	—	31	155
Ovary	—	—	—	—	—	—	—	—	2 680	1 411
Tail	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Table 2 の資料につき横軸に注射後の日数及び組織名をとり，縦軸にカウント数をとつて棒グラフを作成しFig. 1 に示す．

Fig. 1 Relationship between the number of days after injection and the deposition of ^{65}Zn in the tissues.

注射後第 2 日では性腺（睾丸，前立腺，精ノウ）中の放射能が最も強く，54 344 c. p. m.（0. 1144 μc.）次いで脾臓（38 467 c. p. m.（0. 0809μc)），腎臓（26 319c. p. m.（0. 0554 μc.）），膵臓（20 120 c. p. m.（0. 0423 μc.）），心臓（12 405 c. p. m.（0. 0261 μc.））の順であつた，第 6 日では前立腺中葉が最も強く（48 647 c. p. m.（0. 1024 μc.））．前立腺後葉及び前葉（それぞれ 42 455 c. p. m.（0. 0893 μc.），18 549 c. p. m.（0. 0390 μc.）），第13日では脾臓（15550 c. p. m.（0. 0327 μc.））以外は 6 000 c. p. m.（0. 0126 μc.）以下に減少している．しかし肺臓，肝臓，前立腺等についての資料が欠けているので，決定的なことはいえない．ただ骨への沈着が第 2，6，13 日と増加していることは興味深い．注射後第 20日では測定した組織の放射能はすべて 5 000 c. p. m.（0. 0105 μc.）

以下に減少した．

(2) ^{65}Znの尿中排出：Table 3に ^{65}Znを注射した翌日からの24時間尿中の放射能を示す．又この資料により横軸に注射後の日数，縦軸にカウント数をとり，Fig. 2に示す．^{65}Zn注射後尿中への放射能の排出は急激に増加し，24時間で最高に達し，次に第5日まで急激に減少し，以後きわめて徐々に減少することを知つた．なお1例の観察に過ぎないが，注射カウント数に対する注射後第8日目までの排出百分率は0.5%であつた．

Table 3. Radioactivity in urine.

Date of Sampling	Days after Inj.	Ⅰ *		Ⅱ *		Ⅲ *		Ⅳ *		Ⅴ *		Ⅵ *		Ⅶ *	
		Ashed (g)	c.p.m.	Ashed (g)	c.p.m.	Ashed (g)	c.p.m.	Ashed (g)	c.p.m.	Ashed (g)	c.p.m.	Ashed (g)	c.p.m.	Ashed (g)	c.p.m.
32. 1.24	1	0.4186	15 879	—	—	0.0523	2 524	—	—	0.8557	20 714	—	—	0.4078	11 112
.25	2	0.9553	6 210	0.8765	6 488	0.0302	448	—	—	0.8559	2 750	0.8833	2 826	0.8450	4 040
.26	3	0.4949	2 293	0.7763	3 416	0.6755	392	0.3789	1 511	—	—	0.4672	2 146	—	—
.27	4	0.5808	1 952	0.3372	2 229	0.2213	960	0.6523	1 110	0.8181	942	0.7912	1 207	—	—
.28	5	1.0910	1 353	0.9460	1 251	0.5988	687	0.8574	720	0.8256	741	0.8625	897	—	—
.29	6	0.5571	602	0.6661	659	0.6841	—	1.3099	366	0.6900	777	0.4294	469	—	—
.30	7	0.8780	1 300	0.9142	1 253	0.6709	511	1.0605	1 502	0.9676	707	—	—	—	—
.31	8	0.9320	652	0.3140	458	1.0178	694	0.7185	560	1.1857	672	0.5584	434	—	—
2.01	9	0.7553	—	0.2832	434	0.0023	614	0.6548	444	1.0850	416	0.2273	280	—	—
.02	10	0.6436	—	0.3850	362	1.2057	823	0.3423	354	0.2623	385	0.5822	268	—	—
.03	11	0.4666	390	0.5757	739	0.3556	321	0.4105	368	0.4270	613	0.6076	408	—	—
.04	12	0.4192	469	0.7544	1 051	0.5794	598	0.2914	391	0.9026	871	0.8272	492	—	—
.05	13	0.3998	332	0.9197	709	0.8093	682	0.5468	569	0.6347	587	—	—	—	—
.06	14	0.1006	147	0.8457	555	1.0705	474	0.5740	400	0.9337	487	—	—	—	—
.07	15	0.0962	68	0.5754	348	0.6415	371	0.6836	251	0.6685	436	—	—	—	—

* Group Number.

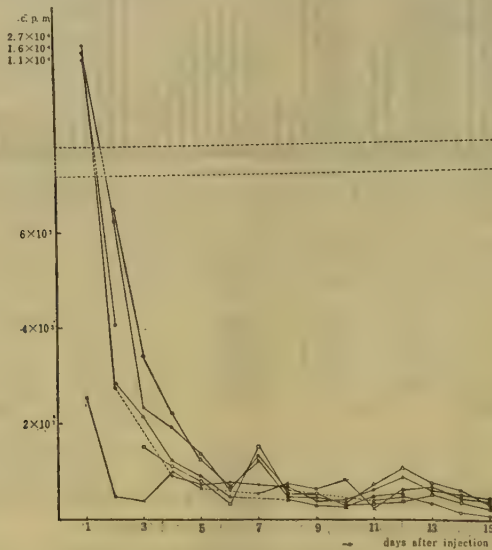



Fig. 2. The excretion of ^{65}Zn in the urine.

○———	Group Ⅰ	△———	Group Ⅱ
×———	Group Ⅲ	□———	Group Ⅳ
●———	Group Ⅴ	▲———	Group Ⅵ
■———	Group Ⅶ		

(3)　^{65}Znの糞中排出：Table 4 に ^{65}Znを注射した翌日からの 24 時間糞中の放射能を示す．又この資料により横軸に注射後の日数，縦軸にカウント数をとり，Fig. 3 に示す．^{65}Zn 注射後糞中への放射能の排出は第 3 日で最高に達し，第 7 日まで急激に減少し，次いで徐々に減少した．しかし第 33日でも 10 000 c. p. m.（0.0210 μc.）を示した．又注射したカウント数に対する糞中への排出百分率を Fig. 4 に示す．これによると注射後第 13日目までに 5 匹の内 4 匹は 21.6～34.4％を排出したが，1 匹は 52.4％の排出を示している．

Table 4.　Radioactivity in feces.

Date of Sampling	Days after Inj.	I *		II *			III *			IV *		
		Ashed (g)	c. p. m.	Ashed (g)	c. p. m.	%	Ashed (g)	c. p. m.	%	Ashed (g)	c. p. m.	%
32. 1.24	1	1.299	—	0.587	206 780	4.1	0.587	157 380	2.5	0.848	277 200	5.2
.25	2	1.397	454 520	1.805	410 625	12.1	0.427	2 009 705	34.7	1.336	595 398	16.2
.26	3	1.298	306 719	1.628	273 624	17.5	0.361	567 116	43.8	0.688	183 965	19.7
.27	4	1.693	166 704	1.707	183 685	21.1	1.800	29 382	44.3	2.255	167 674	22.8
.28	5	1.928	151 192	1.537	283 348	26.7	1.729	95 191	45.8	1.649	69 689	24.1
.29	6	2.207	81 456	1.903	66 329	28.0	2.939	88 205	47.2	1.635	73 247	25.4
.30	7	2.567	83 768	2.873	86 976	29.7	5.616	59 592	48.2	2.515	77 420	26.9
.31	8	1.399	45 899	1.581	27 278	30.2	2.639	51 229	49.0	2.491	60 095	28.0
2.01	9	0.776	26 023	0.915	59 689	31.4	2.603	41 204	49.7	1.982	39 804	28.7
.02	10	1.370	28 175	1.683	71 113	32.8	2.347	106 459	51.4	2.512	43 849	29.6
.03	11	1.308	23 053	1.601	35 804	33.5	1.424	24 335	51.8	2.092	29 236	30.1
.04	12	1.116	17 364	2.413	29 522	34.1	1.983	12 813	52.0	2.108	36 470	30.8
.05	13	1.395	15 148	2.049	17 500	34.4	2.716	28 802	52.4	1.424	31 890	31.4
.06	33	—	—	2.355	8 858	—	2.344	10 598	—	2.189	5 597	—
	34	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	35	—	—	1.874	6 587	—	2.188	7 923	—	1.515	8 361	—
	36	—	—	1.890	5 262	—	1.910	5 378	—	2.054	7 299	—

Date of Sampling	Days after Inj.	V *			VI *			VII *		
		Ashed (g)	c. p. m.	%	Ashed (g)	c. p. m.	%	Ashed (g)	c. p. m.	%
32. 1.24	1	0.902	334 500	5.6	1.527	416 740	7.2	—	175 530	5.9
.25	2	1.851	451 148	13.2	1.228	173 267	10.2	1.249	167 283	11.2
.26	3	1.420	122 721	15.3	0.767	188 434	13.4	—	—	—
.27	4	1.493	117 607	17.3	1.988	115 708	15.4	—	—	—
.28	5	2.352	109 663	19.1	1.748	57 809	16.4	—	—	—
.29	6	1.903	74 584	20.4	1.917	48 043	17.2	—	—	—
.30	7	3.093	61 834	21.4	3.170	62 476	18.3	—	—	—
.31	8	2.737	76 736	22.7	2.336	62 799	19.8	—	—	—
2.01	9	2.325	20 707	23.1	2.290	35 162	20.0	—	—	—
.02	10	1.367	108 134	24.9	1.995	33 844	20.6	—	—	—
.03	11	2.564	29 609	25.3	1.785	26 133	21.0	—	—	—
.04	12	2.703	27 816	25.9	1.410	15 083	21.3	—	—	—
.05	13	3.019	15 885	26.1	2.935	20 664	21.6	—	—	—
.06	33	5.274	12 179	—	—	—	—	—	—	—
	34	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	35	2.044	10 731	—	—	—	—	—	—	—
	36	1.195	8 087	—	—	—	—	—	—	—

*　Group Number.

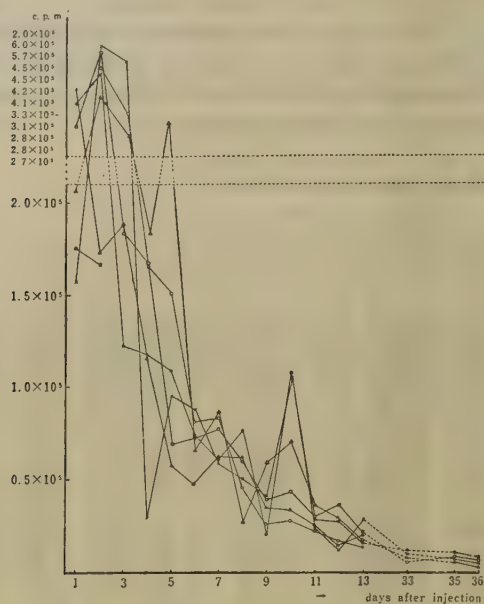



Fig. 3 The excretion of ^{65}Zn in the feces.

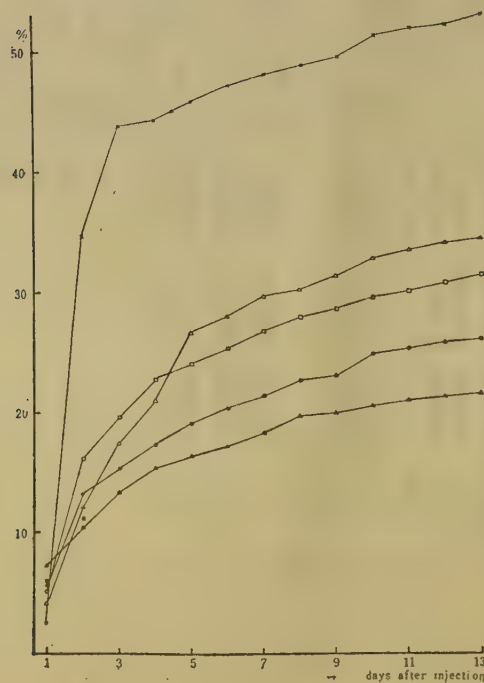
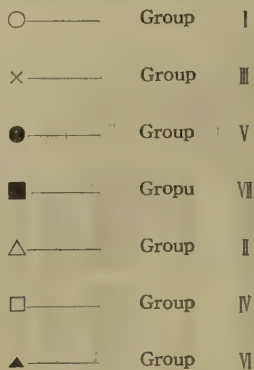
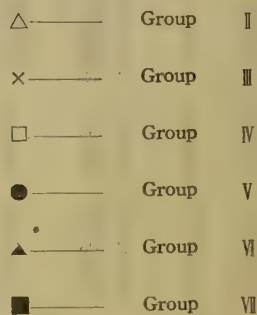



Fig. 4. The percentage of the total sum of excreted ^{65}Zn in the feces.

むすび

^{65}Zn 0.4 mc/kg 体重を白鼠に注射した後の放射能の体内分布，尿及び糞中への排出を調べた．その結果 (1) 注射後第 6 日の組織内への沈着は前立腺中葉が最大であつた．(2) 骨中への沈着は第 13日目まで増加の傾向が見られた．(3) 尿中への排出は注射後 24 時間で最高に達し，第 5 日目まで急激に減少し，以後きわめて徐々に減少した．(4) 糞中への排出は注射後第 3 日で最高に達し，第 7 日まで急激に減少し，次いで徐々に減少した．しかし第 33日でも 10 000 c. p. m. (0.0210 μc.) を示した．糞中への排出は胃腸管から行われると考えられる．

^{65}Zn注射後第13日目の雄及び第 8 日目の雌各 1 匹につき肝臓，腎臓，肺臓，副腎及び膵臓の病理組織学的検索の結果はいずれも変化を認めなかつた．

病理組織学的検索については当所薬理試験部長池田良雄博士，大森義仁博士及び磯野千冬技官に感謝する．

文　　献

1) Scott, D. A., Fisher, A. M. : *J. Clin. Invest.*, 17, 725, (1938).
2) 岡本耕造：内分泌，25, 32 (1949).
3) Weitzel, G., Fretzdorff, A-M. : *Hoppe-Seyler's Z.*, 305, 305, (1956).
4) Montgomery, M. L., Sheline, G. E., Chaikoff, I. L. : *J. Exptl. Med.*, 78, 151, (1943).
5) Sheline, G. E., Chaikoff, I. L., Jones, H. B., Montgomery, M. L. : *J. Biol. Chem.*, 147, 409 (1943).
6) Birnstingel, M., Stone, B., Richard, V. : *Am. J. Physiol.*, 186, 377, (1956).
7) Taylor, S. : *Nature*, 179, 585, (1957).
8) U. S. P. XV, 822, (1955).

Summary

Our studies on the deposition in the tissue and its excretion in the urine and feces of the rats, after the injection of 0.4 mc. of $^{65}ZnCl_2$ solution per kg of body weight, showed the following :

(1) On the 6th day after injection, the deposition of radiation in the dorsolateral lobe of prostate was the largest among other organs.

(2) The deposition of ^{65}Zn in the bone increased continuously for 13 days after injection.

(3) Early after injection ^{65}Zn appeared in the urine, and showed the maximum excretion 24 hrs. after injection ; its excretion, however, decreased rapidly until on the 5th day, then very slowly.

(4) The maximum excretion in the feces occurred on the 3rd day. The excretion decreased rapidly until on the 7th day, then very slowly. The excretion in the feces on the 33rd day, showed 0.025μc per day.

Received June 18, 1957.

微量砒素分析における反射光電比色法の利用　第1報

川　城　　巖，岡　田　太　郎，加　藤　三郎

Microdetermination of Arsenic by Reflectance Spectrophotometry I

Iwao Kawashiro, Tarõ Okada and Saburõ Kato

緒　　言

砒素はそのものの衛生上に占める重要性から微量かつ正確な分析法が古くから要求されて来た．食品中の砒素の検出法には種々の方法が提案されているが，微量定量法としてモリブデンブルー法及びグットツァイト法[1]が広く用いられている．グットツァイト法は公定法にも採用されている鋭敏な方法であるが．これはガス発生瓶中で水素ガスを発生させると同時にH_3Asを発生せしめ，これを沪紙に臭化水銀を含ませた試験紙上に導いて出来る呈色物から定量するもので，その操作上から砒化水素導出管中に試験紙を垂直に懸垂し発する呈色帯の長さを比較する方法[2]と，導出口上に水平に置いて得られる呈色斑点の濃淡を比較する方法[3]とに大別される．

前者の場合には水素発生の速度や試験紙の挿入状態等の諸条件によつて呈色帯の長さが影響され易くまた発色末端が明確でないので測定に多くの不便がある．後者の場合は多少この影響がさけ得るとしても，中間色調の比色は困難であり，個人差が大きいと考えられる．

われわれはこの水平型グットツァイト法による呈色斑点について，直接に分光反射率を測定し，その特性や砒素濃度との関係を吟味した．

反射率測定[4]（Reflectometery)[5]は機器の発達にともなつて，諸方面の化学分析にも応用され，染色物[6)7)]沈澱[8]，沪紙クロマトグラム[9)10)]等の定量分析に関する報告が見受けられる．物質濃度と反射率との関係については数式が提案されている．

(1)　$kC = (1-r)^2 / 2r - k_o$ [6)8)10)]

但し，Cは物質濃度，rは或る特定波長域における反射率，kは比例常数．k_oは測定対照によつて定まり，盲検を対照として反射率100％（$r_o=1$）に合わせて測定するときは$k_o=O$．

(2)　$x=\log C$　$y=\log(r_o/r)=RD$ [9]

(3)　$x=\sqrt{C}$　$y=2-\log R=\log(r_o/r)=RD$ [7]

rは盲検の反射率．（$R=100r$）．$\log(r_o/r)$を反射密度（Reflection Density）と云い RD で表し．透過比色分析の吸光度（$E=\log(T_o/T)$）に相当するもので，測定上同様に扱うことが出来る．

われわれはこれら諸式を検討した結果 (2) 式を適用して砒素の検量線を作成したが，本法による呈色は発生するガス体（H_3As）がその通過する沪紙上の臭化水銀に吸着され．反応する特異なものでその組成も頗る複雑を極めるものであることが認められた．

実験操作

1)　**呈色実験**：すべて衛生検査指針[11]の方法に基いて実施した．ガス導出管はJIS規格[3]装置（内径6.5mm）を用い，下部にガラス綿をつめ，その上に海砂（20～30メッシュ）を2g入れ，10％酢酸鉛溶液でうるおして使用した．試験紙は沪紙東洋No. 50を用いて調製し2cm×2cmに切つて用いた．亜鉛はマリンクロット無砒素亜鉛，他の試薬もすべて特級の砒素の出来るだけ少ないものを用いたが多少の盲検値を認めた．反応は25°C. 1時間，反応後30分以内に測定した．なお，砒素標準溶液はAs_2O_3 0.25γ/ccのものを用時調製して所要量を発生瓶に採取した．

2)　**測定法**：測定はdiffuse reflectance accessory を装置したBeckman DU 及びB 型分光々度計によつた．沪紙の非呈色部分の白色は大きな誤差のもととなり，また斑点が機器の試料窓の中央に位置させることも精度と再現性の向上に重要なことであるから，われわれは黒枠を使用して窓の径をいずれも 7.5mm（JIS規格の呈色斑点の径にほぼ同じ）に絞つた．盲検した試験紙を測定対照（反射率100％，RD＝O）として分光反射率曲線を求めたが，320mμ（スリット巾2.0mm）以上の測定が可能であつた．検量線は360mμ（スリット巾1.2mm），Beckman B 型によるときは測定可能な最短波長である420mμを用いた．MgO白板，原沪紙，未反応臭化水銀紙等を対

照とする場合はなお比較検討中である.

測定結果および考察

上記の如く測定した分光反射率曲線（反射スペクトル）をFig. 1に示した．図の如く最小反射率部位 λmax[4]は濃度によつて激しく変移する．これはH_3Asガスと沪紙上の$HgBr_2$との反応によつて生ずる呈色錯化合物の多様性[12]によるものと考えられる．また，原沪紙を測定対照とした臭化第二水銀紙の反射スペクトルはFig. 2の如くであつて，これらが，特定波長での定量範囲を小さくしている主な原因であると考える．

濃度によりλmaxが変らない一般的な場合[4]と異り，λmaxによる定量測定は不可能である．著者らはまず Beckman B型によつて420mμで各種濃度の斑点を測定した結果（Table 1）を前記三式に適用して検量線の作成を試みたが，(2)式によつて比較的直線的な関係が得られることを知つた（Fig. 3).

Table1. RD Value of colors spots (420mμ)

$As_2O_3\gamma$	0.25	0.50	1.0	2.0	4.0	8.0
(min.)	0.080	0.140	0.285	0.495	0.625	0.682
	0.085	0.164	0.291	0.518	0.628	—
	0.092	0.168	0.346	0.525	0.631	0.688
	0.095	0.168	0.346	0.525	0.647	—
(max.)	0.108	0.186	0.354	0.550	0.654	0.720
ave.	0.092	0.165	0.324	0.523	0.639	0.696

この場合の定量範囲は0.25～4.0γで，その精度はAs_2O_3として±0.03～0.3γ（標準偏差）であつた．

Fig. 1 Reflectance spectra of Gutzeit colorspots.

Fig. 3 $As_2O_3\gamma$－RD relationship (420mμ with Beckman B)

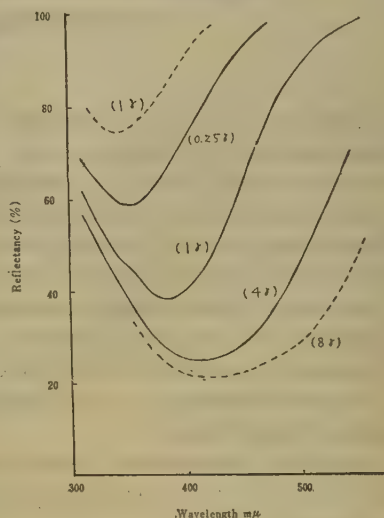



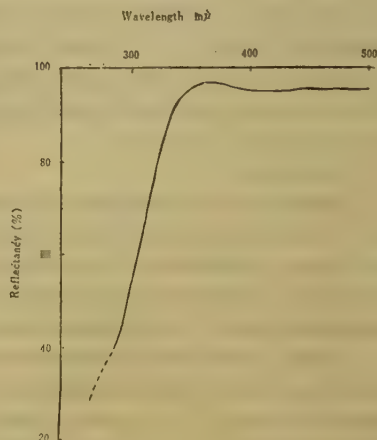
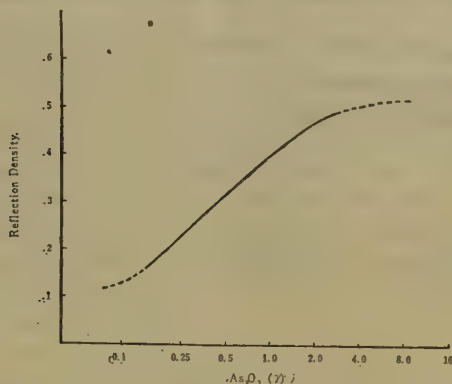
Fig. 2 Reflectancespectrum of $HgBr_2$ Paper (Control: paper)

BeckmanDU型により360mμで測定した結果はTable 2，Fig. 4のとおりである．

Table2.　RD Value of color spot (360mμ)

$As_2O_3\gamma$	0.1	0.25	0.5	1.0	2.0	4.0	8.0
(min.)	0.154	0.256	0.334	0.406	0.473	0.481	0.541
	0.150	0.232	0.320	0.391	0.465	0.485	—
	0.137	0.232	0.319	0.383	0.455	0.486	0.515
	0.128	0.228	0.296	0.375	0.453	0.490	—
(max.)	0.118	0.198	0.286	0.370	0.438	0.498	0.486
ave.	0.137	0.230	0.311	0.385	0.456	0.488	0.514

Fig.4　$As_2O_3\gamma$—RD relationship (360mμ with Beckman DU)

この場合には0.2～2γが定量範囲であり，その精度はおよそ±0.014～0.28γ（標準偏差）であつた．

総　　括

従来グットツァイト法の定量範囲は1～10γでその誤差もかなり大きいとされていた．

われわれは分光反射率測定法を応用することによつて1γ以下の微量の砒素の定量も可能であることを知つた．

水平型グットツァイト法においてH_3Asと$HgBr_2$との反応によつて生ずる呈色斑点をBeckmanDU型及びB型を用いて測定したところ，個人差がなくまた反応条件の影響も少ないことがわかつた．

BeckmanDU型で360mμを用いて測定した結果はAs_2O_3として定量範囲0.2～2γ，標準偏差±0.014～0.28γであり，B型では420mγで定量範囲0.25～4.0γ，標準偏差±0.03～0.3γであつた．

反射測定に関し御援助を賜つた当所山口部長，並びに御便宜を賜つた関東逓信病院久保薬局長及び春日氏に感謝する．

Summary

Arsenic can be determined by a reflectometric method in amount of as low as 1γ.

In principle, the method depends upon isolation of the arsenic on paper as the colored reaction product between arsine and mercuric-bromide. The intensity of the resulting colored complex is evaluated quantitatively with a spectrophotometer fitted with a diffuse reflectance accessory.

It was possible to estimate samples containing from 0.2 to 2γ of As_2O_3 (with Beckman DU.) The standard deviation is within the range of 0.014～0.28γ.

Received June 18, 1957

文　献

1) E.B. Sandell : colorimetric Determination of Traces of Metals. (1950).
2) 日局六, 米局XV, Methods of Analysis A.O.A.C.
3) 英局, 国際薬局方1, JIS (K8004).
4) 山口, 藤井, 太幡, 加藤 : 薬誌, 74, 1322 (1954).
5) D. Patterson : *Anal. chem.*, 27, 582 (1955); M.G. Mellon : *Ibid.* 23, 9 (1951), 24, 3 (1952), 26, 7 (1954)
6) E.I. Steans : *Anal. chem.*, 25, 1004 (1953).
7) 山口, 福島, 伊藤, 薬誌, 75, 556 (1955).
8) 桜場 : 分析化学, 4, 372 (1955).
9) A.E. Goodban, *et. al.* : *J. Agr. Food Chem.*, 1, 261 (1953) ; R.M. Mecready, E.A. Mc Comb : *Anal. chem.*, 26, 1645 (1954).
10) 岡崎 : 本誌, 74, 51 (1956)
11) 厚生省編纂 : 衛生検査指針Ⅲ P.53 (1952)
12) 日本薬学会編 : 衛生試験法註解 P.138 (1956)

モノフルオール酢酸（殺鼠剤）及びモノフルオール酢酸アミド（農薬）の定性，定量について

川城　巖，川田公平，竹内末久

Qualitative and Quantitative Tests of Monofluoroacetic Acid and Monofluoroacetamide

Iwao KAWASHIRO, Kohei KAWATA. and Hidenaga TAKEUCHI

はしがき

先に川城，大久保は食品中よりモノフルオール酢酸の検出を行つたが，[1] 更にモノフルオール酢酸アミドをも含めて，それらの食品中よりの検出，定量のための基礎的研究を行つた．

定性反応はすべてペーパークロマトグラフィー（以下PPC）を用い，沪紙は東洋 No. 52 を用いた．モノフルオール酢酸の検出にはAOAC法があるが[2] PPCには適当でないので，硝酸ランタンとヨウ素による方法[3] 及びヒドロキサム酸としてPPCで分離した後，塩化第二鉄で発色させる方法[1)5)]を試みた．なお他のハロゲン酢酸はアンモニアアルカリ溶媒で分解しやすいが[6]，モノフルオール酢酸は比較的安定なのでアンモニア・アセトンを溶媒に用いた．従来フッ素化合物の定量は主としてアルカリ分解によつて生ずる無機フッ素を水蒸気蒸溜その他の方法で分離したのち，アリザリンレーキの如きもので比色する方法が多いが，極めて操作繁雑で，回収率も良好とはいえないので．モノフルオール酢酸の定量にチオインジコ法[2] を検討した．なお硝酸ランタンとヨウ素で定量する方法[7] があるが，微量定量には適しないと思われる．

酸アミドの定性反応には，窒素をクロール化したのちヨウ化カリウムとオルトトリジン類で発色させる方法[8]，ヒドロキサム酸とし塩化第二鉄で発色させる方法[4] があるが鋭敏な前者を行い，定量法はヒドロキサム酸鉄塩による方法[9] を検討した．

実験の部

(1) モノフルオール酢酸（以下F-acid）のPPC

a）直接法　F-acid-Naを溶媒としてアセトン28%NH_4OH（5：1）を用い，25°でPPCを行い，風乾後La（$NO_3)_3 \cdot 6H_2O$（5g in 25ml）溶液，N/50KI・I_2液，1%NH_4OH 液を順次に噴霧すると青色のスポットを得る．検出限度はF-acidとして0.2mg，Rfは0.29．酢酸は0.19，プロピオン酸は 0.57．なおモノクロロ，ブロモ，ヨウド酢酸は呈色しなかつた．

b）ヒドロキサム酸として行う方法　乾燥F-acid-Naをミクロ試験管にとり，これに硫酸・アルコール（1：20 vol.）混液1滴を加え封管して80°で30分反応させ，冷後飽和アルコール性水酸化カリウム液及び10%塩酸ヒドロキシルアミンアルコール液の混液（1：1）の上澄2滴を加え，再び封管して100°で10分反応させ，冷後これを沪紙に附着，乾燥した後水飽和酢酸エチルで PPC を行う．風乾後1% $FeCl_3$液を噴霧すると，紫赤色のスポットを得る．Rfは0.23（25°）．なお酢酸は0.10，プロピオン酸は0.27，モノクロロ酢酸は0.33であつた．

(2) モノフルオール酢酸アミド（以下F-amide）のPPC

水飽和酢酸エチルで展開，風乾後塩素ガス中に10分さらし，大気中に1～2分放置後，0.5%オルトトリジン50%アセトン液，ヨウ化カリウムアセトン飽和液を噴霧すると青色のスポットを得る．検出限度は 10μg. Rf は 0.49（25°）．アセトアミドは0.24．

(3) F-amideの定量

試薬　① 3.5N-HCl　② 3.5N-NaOH　③ 2M-NH_2OH. HCl　④ 0.074M-$FeCl_3$（ioN/50HCl）

a）3.5N-NaOH 量の検討　F-amide 1 mg/ml液 1 ml に3.5N-NaOH 0.5, 1.0, 2.0ml を夫々加え，更に2M-NH_2OH-HCl 1 mlを加え，25°で 1 hr. 放置し，3.5N-HCl で中和後，$FeCl_3$ 液 1 ml を加え全量を水で 8 mlとし，2 min後島津光電池比色計500mμ. 層長 1 cmで吸光度を測定した．（Fig. 1）3.5N-NaOHは 1 mlがよい．

Fig. 1　Effect of Amount of 3.5N-NaOH

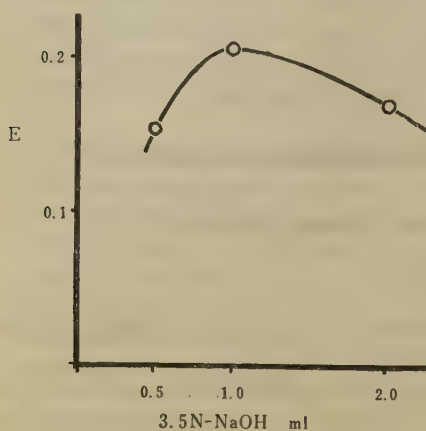



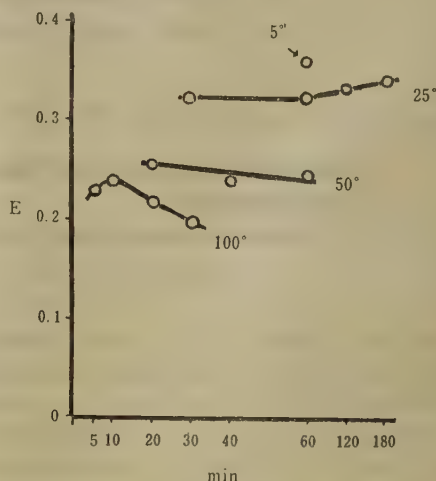
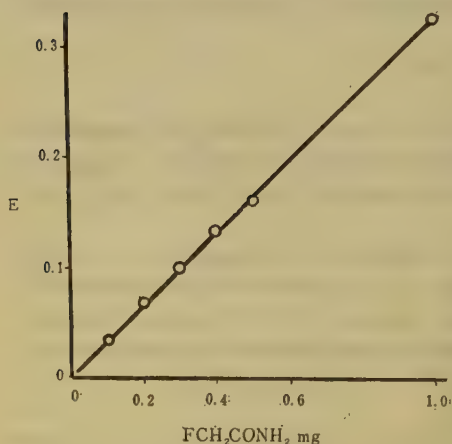
Fig. 2　Effects of Reaction Temp. and Period

b) 反応温度，反応時間の検討　F-amide 1 mg/ml 液 1 ml，に3.5N-NaOH 1 ml，2 M-NH_2OH.HCl 1 mlを加え，温度，時間を変えて反応させ，3.5N-HClで中和し，$FeCl_3$液で発色させ，そのままa）と同様に吸光度を測定した．（Fig. 2）

Fig. 3　Calibration Curve of FCH_2CONH_2

c) 定量曲線　前項により反応温度は低温が良い様であるが，25°で1時間反応させ吸光度曲線を作った(Fig. 3)0.1mg以上のF-amideがほぼ定量できるが，呈色の褪色速度は早く，反応15分後で1 mg/ml の濃度のもので吸光度は約79%に下つた．

(4) F-acidの定量

試薬　① N-NaOH　② チオサリチル酸液：チオサリチル酸0.3gにN-NaOH 2 ml及び水18ml を加える。③2%フェリシアン化カリウム液

a) チオインジゴ硫酸溶液の吸収曲線　F-acid-Na数mgを蒸発皿にとり，水2 ml，N-NaOH1.5ml及びチオサリチル酸液1ccを加え130°の乾燥器中で2時間加熱，冷後水に溶かし，水溶液の一部に2%フェリシアン化カリウム液を液が黄色味を呈するまで加え，生じた紫紅色の沈澱を遠心分離し，更に水洗した後，濃硫酸5 ml にとかしてこの青緑色の可視部の吸収曲線を作る（Fig. 4）max. は670mμであつた．なおこの色は安定で2時間後も不変であつた．この紫紅色の沈澱はベンゼン及びクロロホルムに溶け，黄赤色の螢光を発する．

Fig. 4 Absorption Curve of Thioindigo

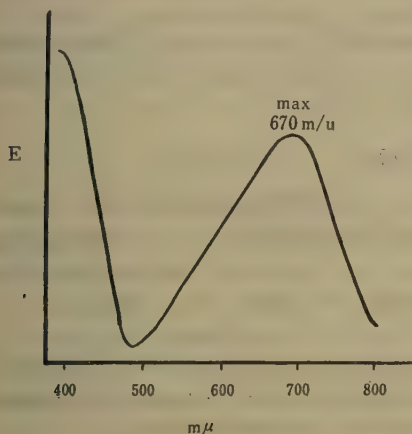
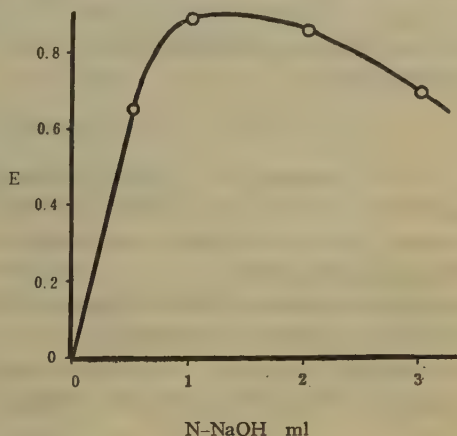
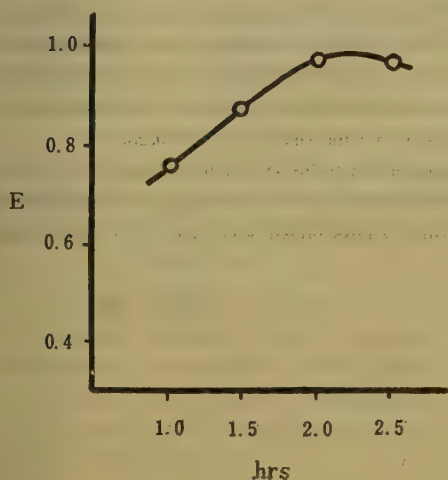
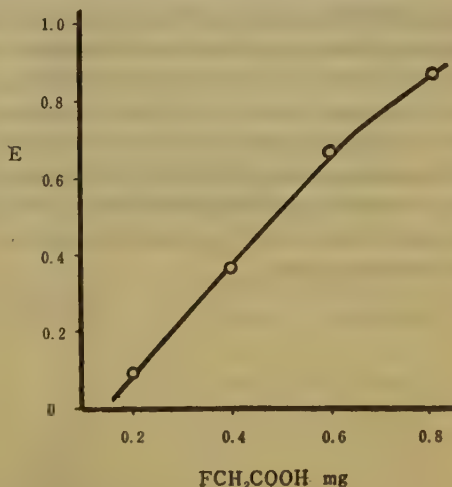



Fig. 5 Effect of Amount of N-NaOH

b) N-NaOH量の検討 AOAC法[2]に従つて行つたとき，チオインジゴの生成量は再現性に乏しかつた．しかし水浴上の乾燥を省いて行つたとき或程度満足できた．

小蒸発皿にF-acid 405μg/ml液2 mlに夫々N-NaOH 0，0.5，1.0，2.0，3.0ml，及びチオサリチル酸液1 mlを加え130°で1.5時間反応させ冷後少量の水に溶かし，2％フェリシアン化カリウム液を液が黄色味を帯びるまで加え，生じた赤沈を小遠心管に移して遠心分離し，更に水10ml にて洗い，遠心分離し硫酸5 ml に溶かし，島津光電池比色計653mμ層長0.5cmで比色する．（Fig. 5）N-NaOHは1.5ml用いることにした．

c) 反応温度の検討 F-acid 405μg/ml 液2 ml にN-NaOH1.5ml及びチオサリチル酸1 mlを加え，反応温度を変えて1.5時間加熱後2％フェリシアン化カリウム液を加え一以下b）と同様に処理した．115°，130°，145°でも余り相違がなかつたが，130°を用いることにした．

d) 反応時間の影響 F-acid 405μg/ml 液2 mlにN-NaOH 1 ml，チオサリチル酸液1 ml を加え，130°にて反応時間を変えてチオインジゴの生成量を比較した．（Fig6.）反応時間は2時間を用いることにした．

Fig. 6 Effect of Reaction Period　　Fig. 7 Calibration Curve of FC H_2COOH

e) 定量曲線 以上の検討により次の操作で定量曲線を作つて見た. F-acid液2mlを小蒸発皿にとり, これにN-NaOH1.5ml, チオサリチル酸液1mlを加え, 130°で2時間反応させ, 冷後少量の水に溶かし, 2%フェリシアン化カリウム液を液が黄色味を帯びる迄加え, 生じた赤沈を遠心分離し, 水10mlで洗つた後, 硫酸5mlに溶かし, 生じた青緑色を島津光電池比色計653mμ, 層長0.5cmで比色する. (Fig.7) 誤差は±10%であつた. 0.2mg以上が定量できる.

総 括

モノフルオール酢酸並びにアミドの定性, 定量法を検討した. モノフルオール酢酸はそのままアセトン, 28%NH_4OH (5:1) でペーパークロマトを行い, La $(NO_3)_3$液, KI_3液, NH_4OHで発色させるとRf 0.29に青色の斑点を得る. またヒドロキサム酸とした後水飽和酢酸エチルでペーパークロマトを行い. $FeCl_3$液で発色させるとRf0.23に赤色の斑点を得る. モノフルオール酢酸アミドは水飽和酢酸エチルで展開したのち, 塩素にさらし, 後オルトトリジン, KI液によりRf 0.49に青色の斑点を得る.

モノフルオール酢酸アミドの定量法としてヒドロキサム酸鉄塩の比色を行つた. 0.1mg/ml以上が定量できるが, 色は不安定で褪色しやすい. モノフルオール酢酸の定量として130°でチオインジゴを生成させ, これを硫酸溶液となし, 青緑色を比色することにより, 0.2mg以上のモノフルオール酢酸が簡易定量できた.

文 献

1) 川城, 大久保: 本誌 72, 171 (1954)
2) Methods of Analysis of AOAC 442 (1955)
3) Feigl F.: Spot Tests Ⅱ. p. 247 (1954) Elsevier Publish. Co.
4) 同 上 p.171.
5) Bergmann F. and Segal R.: *Biochem. J.* 62, 542 (1956)
6) Woidish K., Schmid L., and Gnauer H.: *Z. Lebensmittel-Untersuch u.-Forsch.* 104, 401 (1956)
7) Hutchens J.O. and Kass B.M.: *J. Biol. Chem.* 177, 571 (1941)
8) Zahn H. and Rexroth E.: *Anal. Abst.* 3, 1055 (1956)
9) Bergmann F.: *Anal. Chem.* 24, 1367 (1952)

Summary

Develop the chromatogram by ascending chromatography using water saturated ethyl acetate on a strip of Tōyō filter paper No. 52, and then treat with Cl_2 gas, spray o-tolidine solution and KI solution, FCH_2CONH_2 give a blue spot at Rf value 0.49. FCH_2COOH is developed with acetone-28%NH_4OH mixture(5:1), and treated with $La(NO_3)_3$, KI_3 and NH_4OH solution, give a blue spot at Rf 0.29. In another method, FCH_2COOH is converted to hydroxamic acid and developed with water saturated ethyl acetate, and treated with $FeCl_3$ solution, so give a wine red spot at Rf 0.23.

In quantitative tests, FCH_2CONH_2 is determined by conversion to Fe salt of hydroxamic acid, which color is wine-red, with NH_2OH and $FeCl_3$. FCH_2COOH is converted to thioindigo by heating with thio-salicylic acid at 130°, and dissolved in H_2SO_4, which shows bluish green color, so determined by colorimetric method.

Received June 18, 1957

農薬モノフルオール酢酸アミドの残留試験(II) 茶及び柿について

川 城　巖，竹 内 末 久

Determination of Residual Monofluoroacetamide (II) In Tea Leaf and Persimon.

Iwao KAWASHIRO and Hidenaga TAKEUCHI

は し が き

先にわれわれは冬期の夏橙についてモノフルオール酢酸アミドの残留試験を行つたが[1]，今回は夏期における茶及び柿について行つた．前回は有機フッ素の分解をヘキシルアルコール中金属ナトリウムで行つたが，操作繁雑で石英コルベンを用いるときは，往々にして溜液が濁るので，今回はAOAC法[2]に従つた．また茶葉は元来多量の無機フッ素を含有しているので，エーテル抽出を加えて一応無機フッ素を分離した．

実 験 の 部

(1) 分　析　法

a) 茶の場合　茶葉を細切してその10～20gをソックスレット抽出器にとり，アルコールで約4時間抽出する．次にアルコール液に水酸化ナトリウム0.1g，フェノールフタレイン液2滴を加え，弱アルカリ性であることを確めたのち，水浴上でアルコールの大部分を溜去し，のち空気を送つて溶媒をとばす．残溜物に水約60cc，硫酸5ccを加えて1時間弱く煮沸し，冷後これを液体抽出器に移し，エーテルで約4時間抽出する．エーテル液に約同量のアルコールを加え，10% 水酸化ナトリウムを加えてフェノールフタレインアルカリ性とし，水浴上でおだやかに溶媒を溜去する．残溜物を水20～30ccを用いて白金皿に移し，フッ素含量少なき水酸化カルシウム1gを加えて混合し，水浴上で殆んど蒸発乾燥したのち，小焔で徐々に炭化し，次に600°で灰化する．冷後約10ccの水で湿めし，時計皿でおおい，60% 過塩素酸を灰が溶けるまで静かに加え，これを水蒸気蒸溜フラスコに移す．白金皿及び時計皿は更に60%過塩素酸で洗い，洗液を水蒸気蒸溜フラスコに合す．更に60%過塩素酸を加え（総量80cc)，更に過塩素酸銀1g，小硝子球数個を加え，135～137°で水蒸気蒸溜し，溜液500ccを集め，その50ccをとりジルコニウムアリザリン法でフッ素を定量する．即ちフッ素含量0～50μの標準液50ccを作り，それぞれにジルコニウムアリザリン液（アリザリンスルホン酸ナトリウム0.35g，ジルコニウムオキシクロライド0.3g，硫酸40cc，塩酸120ccを水に溶かして1lとし，用時水で2倍容にうすめる）5ccを加え，同時に検液50ccにも同様操作し，各比色液を室温で同一温度に保つて2時間放置後，530mγで比色してフッ素含量を求める．モノフルオール酢酸アミド500γを含有する茶について行つたとき回収率は48%であつた．

b) 柿の場合　細砕した柿果実100gに水50ccを加えホモジナイザーでよく混合する．後綿布で沪過し，沪液100ccをとり，これに20%メタ燐酸液10cc，硫酸5ccをふりまぜながら加え，10分放置後遠心分離し，上澄液を1時間弱く還流煮沸する．冷後この一定量を液体抽出器に移し，エーテルで約4時間抽出以下茶と同様に処理する．モノフルオール酢酸アミド1mg含有の柿について行つたところ回収率は58%であつた．

(2) 残　留　試　験

a) 撒布要領　昭和31年8月15日，千葉大学園芸学部農場に於て，茶は高さ80cm，巾85cm，長さ30mのものにモノフルオール酢酸アミド500倍液4.5l，を柿（富有15年）には同じ500倍液2.5lを撒布した．

b) 残　留　量（Fとして）

Table 1.に示す．

Table 1.

Days after Spraying	Residue (ppm as F)	
	Tea Leaf	Persimmon
0	4.0	0.3
10	2.0	0.2
20	0.75	0.1
30	0	0
40	0	0

なお試験期間中の気象状況をTable2. に示す.

Table2. Weather during the Experiment

Date	Temp at am9.00	Rainfall mm	Humidity (%)atam9.00	Weather	Date	Temp at am9.00	Rainfall mm	Humid:ty (%)atam9.00	Weather
8.15	28.9	3.5	69	fine	9. 5	24.2	—	90	cloudy
16	23.5	—	95	cloudy	6	28.0	—	82	fine
17	28.8	3.1	77	clear	7	28.9	—	75	clear
18	28.0	—	65	fine	8	28.3	—	80	clear
19	24.5	—	97	clear	9	28.4	—	75	clear
20	24.8	—	56	fine	10	28.5	—	79	clear
21	24.2	0.6	68	cloudy	11	27.6	1.5	86	cloudy
22	21.0	15.2	89	rainy	12	25.6	—	80	fine
23	22.2	2.7	67	fine	13	21.6	34.2	96	rainy
24	20.6	14.7	96	rainy	14	19.2	4.0	90	cloudy
25	22.9	0.1	92	cloudy	15	18.4	0.2	94	rainy
26	24.2	—	68	cloudy	16	20.1	16.7	89	rainy
27	20.9	0.6	85	cloudy	17	14.6	16.6	94	rainy
28	23.2	9.0	87	cloudy	18	19.6	—	94	clear
29	19.6	25.4	99	rainy	19	22.0	3.6	80	clear
30	19.4	16.3	96	rainy	20	21.6	—	95	rainy
31	20.9	—	95	cloudy	21	22.4	0.6	76	clear
9. 1	21.2	—	90	cloudy	22	20.2	12.0	92	rainy
2	23.4	—	97	cloudy	23	23.0	—	60	clear
3	23.4	—	96	cloudy	24	21.6	—	59	fine
4	26.6	—	75	clear					

総　　括

夏期に於けるモノフルオール酢酸アミドの残留試験を茶及び柿について行つたところ，約30日でその残留を認めなくなつた.

終りに撒布，検体の採取，輸送，気象の記録を担当していただいた千葉大学教授，野村博士に深謝する.

文　　献

1) 川城，竹内：衛生化学 4，91 (1956)
2) Methods of Analysis of A. O. A. C. 389 (1950)

Summary

We studied on the residual amounts of FCH_2CONH_2 in tea leaf and persimon in summer times,- and 30 days after spraying, any amount of FCH_2CONH_2 were not detected in both tea leaf and persi mon.

Received June 18, 1957

農薬O-エチル-O-パラニトロフェニルベンゼンチオホスヘイト(EPN)の残留試験

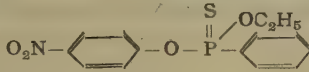
川城　巖，竹内末久，江島　昭

Determination of Residual O-Ethyl-O-p-nitrophenyl benzenethiophosphate (EPN) in Plants

Iwao KAWASHIRO, Hidenaga TAKEUCHI, and Akira EJIMA

はしがき

われわれはすでに有機燐剤としてＯＭＰＡの残留試験を多種の植物について行つたが，[1] 今回はＥＰＮの残留試験を冬期大根及び白菜について行つた．ＥＰＮは次の構造式を有し，その性質もパラチオンに近いので，分析法

$$O_2N-C_6H_4-O-\overset{S}{\overset{\|}{P}}(OC_2H_5)-C_6H_5$$

はパラチオン試験法[2] 中のジアゾ化法に依つた．

実験の部

(1) 分析法

a) 葉の場合　よくすりつぶした試料 50g を共栓三角フラスコにとり，ベンゼン100ccを加えて約3 hrs. 振とう抽出する．径約1 cmのクロマト管に200メッシュのクロマト用アルミナ10gをベンゼンでつめておき，過剰のベンゼンを除いておく．先の抽出ベンゼン液80ccをとつてクロマト管に注ぎ，毎min 1～2 ccの速度で流下させる．抽出液が流下し終つたならば更にベンゼン 50cc を同様に流下させて洗い，洗液を先の流出液に合す．次に室温で送風して溶媒をほとんどとばし，残留物をアルコール10ccに溶かし，200cc のコニカルビーカに移す．これに水10cc 5 N塩酸 2 cc，亜鉛末0.5gを加え，時計皿でおおい，ゆるやかに 5 min間煮沸する．冷後50ccのメスフラスコ中に濾過し，0.25%亜硝酸ナトリウム液 1 ccを加えてよくふりまぜる．10min 後に2.5%スルファミン酸アンモニウム液 1 ccを加えてふりまぜ，再び10min間放置する．これに 1 %N-（1-ナフチル）エチレンジアミンジハイドロクロライド液 2 cc及びアルコール20cc を加え，水で定容としたのち，10min後に 550mμで吸光度を測定し，予め同様操作して作製した検量線よりＥＰＮの含量を求める．大根葉について80γ及び400γのＥＰＮを含有するものについて回収試験を行つたところ，回収率は夫々53.3%，69.0%であつた．

b) 大根の場合　大根300gをとり，大根オロシでその皮部を約 1 cmすり，これを共栓フラスコにとり，ベンゼン100ccを加えて—以下a）と同様に処理する．

(2) 残留試験

a) 撒布　昭和31年11月28日　千葉大学園芸学部農場において，ＥＰＮ乳剤（有効成分45%）の500 倍液を大根（理想）には 1 株当り34.3cc，白菜（山東）には35.6ccを撒布した．

b) 試験結果

Table 1 及びFig. 1 に示す．

Table 1. The Results

Days after spraying	EPN Residue ppm		
	Japanese Radish	Japanese Radish greens	Chinese Cabbage
0	0.165	23.64	13.37
5	0.035	3.34	3.58
10	0.357	5.98	3.87
20	0.032	4.35	7.15
28	0	6.04	4.70
40	0	0	0.23
50	—	0	0

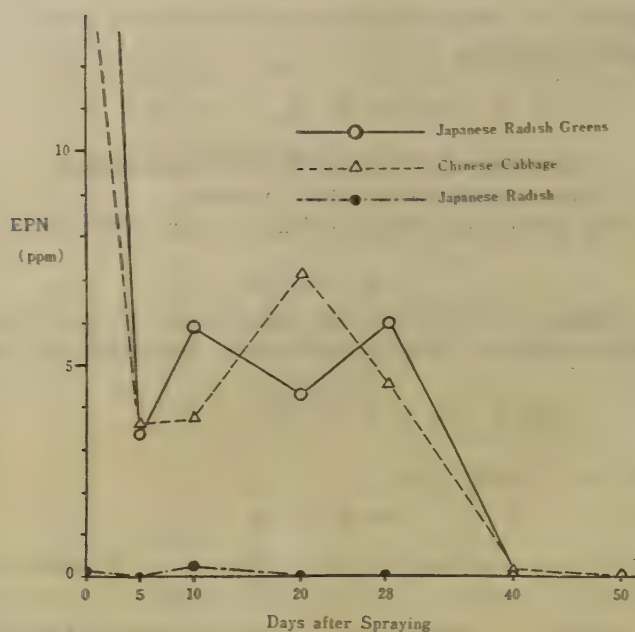
Fig. 1 Residue Amounts of EPN

なお試験期間中の気象をTable 2に示す．

Table 2. Weathers during the Experiment

Data	Temp. at am9.00	Rainfall (mm)	Humidity at am 9.00(%)	Weather	Date	Temp. at am 9.00	Rainfall (mm)	Humidity at am 9.00 %	Weather
11. 29	5.5	—	73	fine	12. 24	1.8	—	60	fine
30	6.6	—	48	〃	25	−0.1	—	75	〃
12. 1	3.4	—	69	clear	26	1.5	—	63	〃
2	7.6	—	62	fine	27	2.4	—	50	〃
3	4.6	—	79	〃	28	−1.1		77	clear
4	7.0	—	94	clear	29	4.4	—	52	fine
5	12.9	—	94	fine	30	0.7	—	92	〃
6	5.2	—	58	〃	31	3.4	—	87	〃
7	4.2	—	66	〃	1. 1	4.0	—	76	〃
8	4.4	—	78	clear	2	3.6	0.1	72	cloudy
9	4.4	2.0	83	cloudy	3	4.4	0.1	44	fine
10	4.8	—	55	fine	4	4.7	0.2	93	rainy
11	3.1	—	56	〃	5	3.5	—	40	clear
12	4.9	—	54	〃	6	1.0	—	79	〃
13	1.9	—	62	〃	7	2.9	—	49	fine
14	3.6	—	40	〃	8	1.2	—	84	〃
15	0.2	—	88	〃	9	1.2	—	92	〃
16	5.6	—	56	〃	10	3.8	—	60	clear
17	5.8	—	43	〃	11	1.9	—	83	cloudy
18	2.4	—	66	〃	12	5.7	—	69	〃
19	2.9	—	53	〃	13	2.4	—	98	fine
20	4.6	—	55	〃	14	2.5	—	89	〃
21	2.8	—	45	〃	15	11.8	—	63	clear
22	2.1	—	86	〃	16	9.3	—	49	fine
23	−1.2	—	90	〃	17	5.4	—	84	clear

総　　括

白菜及び大根についてEPNの残留試験を行つた．冬期であり，また降雨量少き故か，残留期間は意外にながく，約1カ月後にも相当量のEPNを認めたが，急激に減少して40日目には殆ど認めなくなつた．

終りに，本試験のうち，撒布，試料の採取輸送，気象の記録は千葉大学教授野村博士に担当していただいた．ここに感謝の意を表する．

文　　献

1) 川城，藤井，林，江島，加藤：本誌 73，205 (1955)
2) 川城，江島：本誌 72，177 (1954)

Summary

The analyses of residual EPN in Japanese radish and Chinese cabbage were studied. 30 days after spraying, considerable amounts of EPN were remained, that was probably due to low temperature and little rainfall, but then the residue decreased rapidly, and after 40 days any amount of EPN were not observed in both Japanese radish and Chinese cabbage.

Received June 18, 1957

モノアゾ色素還元成績体の沪紙クロマトグラフィーについて

藤 井 清 次，神 蔵 美 枝 子，細 貝 祐 太 郎

Paper Chromatography of Reduction Products of Monoazo Dyes.

Seiji FUJII, Mieko KAMIKURA and Yūtarō HOSOGAI

ま え が き

アゾ色素の確認には，沪紙クロマトグラフィー，分光吸収測定法及び試薬による呈色反応等いろいろ方法があるが，アゾ色素を還元して生じたアミン類を検出することによつて元の色素の構造を確認する方法は，Witt[1]，上野[2] 等の報告がある．L. S. Harrow[3] 等は色素を還元後生じたアミン類の分離にカラムクロマトグラフィーを組合せてその確認を行つている．先に著者等は，色素を還元後生成アミンについて濾紙クロマトグラフィーを行いこれらを分離確認する方法[4]，を報告したが，北原[5] 等もこれらについて濾紙クロマトグラフィーを行つているが，著者等は新たに還元剤としてハイドロサルファイトを使用し水溶性と油溶性色素７種について実験を行い２，３の知見を得たので報告する．一般にアゾ色素の還元剤としては，塩化第一錫[1]，三塩化チタン，亜硫酸ソーダ及びハイドロサルファイト等いろいろあるが，これらの中で塩化第一錫及び三塩化チタンを使用した場合は生じたアミンはすべて塩酸塩型となり又，亜硫酸ソーダ及びハイドロサルファイトを使用した場合はすべて生成アミン類は塩基型となる．前者の報告はいずれも色素の還元に塩化第一錫塩酸溶液を使用するものであるが，還元生成アミンがアニリン及びP- ヂアミン系等の場合は，沪紙クロマトグラフィー展開中に沪紙上で遊離アミン型及び塩酸塩型の２つに解離しスポットの判定が困難であつた．

この現象は展開溶媒の種類にもよるが塩酸を充分に含んだブタノールを使用した場合はこの現象は比較的表われにくいが，展開沪紙中に，これらが強く吸着されておりヂアゾ化発色時に種々不便を感じた．そこで我々は，ブタノールを主成分とする分配型溶媒Ｆ１－７を使用し，還元剤としてはハイドロサルファイトを用いてこれらを組合せて沪紙クロマトグラフィーを行つた結果，心配された生成アミンの変化も少なく発色剤としては紫外線照射，エールリッヒ試薬[6]，及び津田試薬[7] 等を利用し明瞭なスポットが得られたが一部の溶媒では展開中スポットが若干着色するものがあつた．

実 験 の 部

(1) **試料の精製** 市販の水溶性アゾ色素は一般的に工業的製品でありとくにカップリング成分のナフタリンスルフォン酸類が低純度の原料を使用した場合は，製品化された色素の中に副色素を含むことがあるので50％エタノールより数回再結晶して使用した．またこれらの方法によつても純品が得られなかつたものは，合成原料を蒸留及び再結晶等の操作をくりかえし[8)9)10]．これらを原料として色素を合成した．なおこれら色素については，沪紙クロマトグラフィー法[11]，及び吸収スペクトル等の検査を行い純品についてのみ試料とした．

(2) **試料および還元** 精製した前記のモノアゾ色素７種を用いた．次にこれらの色素及び還元生成アミン[9)10] をTable 1に示す．

Table 1. Reduction Products of Dyes

Dye	Reduction Product	
Tartrazine (640)	Sulfanilic acid	1-4-Sulfophenyl-3-carboxy-4-amino -5-hydroxypyrazole
Amaranth (184)	Naphthionic acid	1-Amino-2-naphthol-3, 6-disulfonic acid
Orange 1 (150)	Sulfanilic acid	1-Amino-4-naphthol
New coccine (185)	Naphthionic acid	1-Amino-2-napthol-6, 8-disulfonic acid
Ponceau R (79)	m-Xyridine	1-Amino-2-napthol-3, 6-disulfonic acid
Sudan I (24)	Aniline	1-Amino -2-napthol

Acid orange R (28)	Aniline	1-Amino-2-napthol-3, 6-disulfonic acid

Note : Number in parenthesis following name of a dye represents number of that dye as listed in "Colour Index," 1st. ed., 1924.

還元法としては，上記の色素約0.1gを約10ccの水又はアルコールに溶解し．これに用時新たに調製したハイドロサルファイト10%水溶液を色素が完全に脱色するまで加える，この際加温することはなるべく避けたほうが好結果がえられた．ついで本還元液を東洋沪紙NO.50の幅約8cm．長さ約40cmの型に切つたものに下端より約4cmの所に約0.01ccをスポットしシリンダー中で溶媒が約25～27cm上昇するまで展開した．本沪紙を使用すると異つた4試料が同時に展開できる．

（3）**発色剤** A. 紫外線．Mineralight (model SL 2537) を用いた．生成アミン類のナフタリンスルフォン酸類はいずれも強い螢光を発した．B. エールリッヒ試薬（P-dimethylaminobenzaldehyd）5% methanol溶液にその全体量の1/3量の塩酸（比重1.18）を加えた．本試薬により生成アミン類は黄色となるものが多い．C. 津田試薬．（N-diethyl N′- Naphthylethylendiamine Oxalate）0.2%alkohol溶液．本試薬をスプレーする以前に0.1N塩酸に亜硝酸ソーダを0.2%の割に溶解したジアゾ化液（使用直前にとかす）をスプレーして還元生成アミンをジアゾ化し，ついで沪紙を50°で短時間乾燥し過剰の亜硝酸を分解してからスプレーし発色させる．本試薬で還元生成アミンは紫色になるものが多い．なお一部の生成アミンはジアゾ化液によつて黄色となるものがあつた．またこれらの発色剤の中では紫外線照射が最も鋭敏であつた．

（4）**展開溶媒** アミン類の展開溶媒については各種あるが，われわれは，いろいろの溶媒について実験を行つた結果つぎの組成[11]のものを使用した．

Table 2. Composition (Volume Ratio) of Developing Solvent.

F-1	BuOH : EtOH : N/2 NH_3	(60 : 20 : 30)
F-2	BuOH : EtOH : N/2 AcOH	(60 : 20 : 30)
F-5	BuOH : EtOH : H_2O	(60 : 20 : 30)
F-6	BuOH : Pyridine : H_2O	(60 : 30 : 40)
F-7	BuOH : Pyridine : H_2O	(60 : 30 : 40)

（5）**Rf** 前記溶媒を用いて測定したRfは次の通りである．

Table 3. Rf Values of Redection Products.

Dye	Reduction product	Solvent F-1	F-2	F-5	F-6	F-7
Tartrazine (640)	1. Sulphanilic acid	0.30	0.29	0.24	0.40	0.44
	2. 1-(4-Sulfophenyl)-3-carboxy-4-amino-5-hydroxypyrazole	0.05	0.05	0.05	0.10	0.05
Amaranth (184)	1. Naphthionic acid	0.45	0.40	0.37	0.55	0.55
	2. 1-Amino-2-naphthol-3, 6-disulfonic acid	0.04	0.07	0.06	0.07	0.12
Orange 1 (150)	1. Sulfanilic acid	0.30	0.29	0.24	0.4	0.44
	2. 1-Amino-4-naphthol	0.95	0.90	0.97	0.96	0.97
New coccine (185)	1. Naphthionic acid	0.45	0.40	0.37	0.55	0.55
	2. 1-Amino-2-naphthol-6, 8-disulfonic acid	0.05	0.13	0.10	0.18	0.15
Ponceau R (79)	1. m-Xyridine	0.92	0.91	0.92	0.94	0.98
	2. 1-Amino-2-naphthol-3, 6-disulfonic acid	0.04	0.07	0.06	0.07	0.12
Sudan 1 (24)	1. Aniline	0.90	0.90	0.93	0.99	0.98
	2. 1-Amino-2-naphthol	0.91	0.94	0.94	0.95	0.98
Acid orange R (28)	1. Aniline	0.90	0.90	0.93	0.99	0.98
	2. 1-Amino-2-naphthol-3, 6-disulfonic acid	0.04	0.07	0.06	0.07	0.12

総　　括

以上の結果よりみて各溶媒ともアミノナフタリンスルフォン酸類はいずれも Rf が低くまたこれら相互間の Rf も大差がないが本法では，混合色素の場合の確認は不能でありあくまでも単独な色素の確認にのみ限られる．精製した色素について還元を行い検体と両者を並べて同一沪紙上にスポットし展開すれば，両者の異同識別が出来る．なおF－6及びF－7の溶媒では展開中に2•3のスポットに若干の着色があつたが発色等の操作には影響がなかつた．ハイドロサルファイトのみの Blank も発色には影響がなかつた．またHarrow[3] 等の1-アミノ-2-ナフトールのキノン化も本操作中では生じなかつた．常法の色素沪紙クロマトグラフィーに本法をくみあわせれば2次元展開の可能性もありまた油溶性色素に対する応用もありこれらについては次報にゆずることとする．

文　　献

1. Witt : *Zeitsch. Anal. chem.*, 26, 100 (1887)
2. 上野：理化学研究所彙報 6, 761 (1827) ;7, 49,398, 467 (1928)
3, Jones, Harrow : *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, 34, 884 (1951) ; 36,914 (1953)
4. 藤井：第73回日本薬学会年会発表（昭和28年）
5. 北原，檜山：工化58, 4, 293 (1955)
6. 刈米，橋本：薬研 22, 486 (1950)
7. 百瀬：有機定性分析 112 (1954)
8. 日本学術振興会：染料中間体及助剤品位検定法. (1950)
9. Allen's Commercial Organic Analysis, Fifth ed., Vol. Ⅵ.
10. Fierz-David, H. E. : Künstliche organische Farbstoffe, (1926)
11. 藤井：本誌，73, 335 (1955)

Summary

Studies were made on the paper chromatography of reduction products of monoazo dyes by ascending method. Monoago dyes used were Tartrazine, Amaranth, Orange 1, New coccine, Ponceau R, Sudan1, Acid orange R. Sodium hydrosulphite was used as reducing agent of dye. As the result, F-1 and F-2 is the most preferabe solvent for separation of reduction products. Ehrlich's reagent, Tsuda reagent and ultraviolet light were used for location of reduction products in the chromatogram.

Received June 18, 1957

食品中の繊維素グリコール酸ナトリウムの定量法に関する研究（第1報）
ケチャツプ，ジャム及びマーマレード中の定性，定量について

藤 井 清 次，原 田 基 夫

Studies on the Determination of Sodium Carboxymethylcellulose in Foods (I)
On the Detection and Determination of Sodium Carboxymethylcellulose in Ketchup, Jam and Marmalade

Seiji Fujii and Moto-o Harada

ま え が き

繊維素グリコール酸ナトリウム（Na-CMC，以下この略称に従う）は主として増粘及び結合剤として食品に広く使用される．食品に対する使用限度は2％であるが実際の使用量はアイスクリーム0.5～1％，水菓子0.5％，ジャム2～3％，キャラメルの軟化防止1％，ケチャップ0.5～1％，濃厚ソース2～3％程度[1]あるいはそれ以下である．食品に加えられたNa-CMCを定量することは甚だ困難である．その理由は市販のNa-CMCはそのエーテル化度（置換度，Degree of Substitution＝D. S.，以下この略称に従う）が一定せず，またNa-CMCと反応する特異的な試薬がないからである．更に現在，我が国において製造されているNa-CMCは水に透明に溶解するものがなく常に多少の未反応繊維及び水不溶性の低エーテル化物を混在する．著者らは現在迄の報告を検討[2]した結果，食品中からNa-CMCを分離する操作として銅塩沈澱法[3]を用い，沈澱したCMC銅（Cu-CMC，以下この略称に従う）をナフタレンジオール法[4]で比色定量する方法が適当であると考えられたので，市販のケチャップ，ジャム及びマーマレード等のペクチン質食品に応用した．この結果これら市販品についてはいずれも検出されなかつたので，著者らはまずD. S. 既知のNa-CMCをこれら市販品及び特に自製したケチャップ，ジャムに添加しその回収率を測定したので報告する．

実 験 の 部

(1) ナフタレンジオール法による定量法の検討　ナフタレンジオール（2,7-Dihydroxy-naphthalene）法においてNa-CMC及びグリコール酸の吸収曲線は全く同一であること，D.S. の相違に従つて検量線も相違すること，その理論値と分析値はよく一致すること，またその測定法などについてすでに述べた[2]．またNa-CMCによる呈色の強さはBeer's の法則に従うこと，呈色物質は数時間安定であることはすでに知られているが，著者らは更に他の条件について少しく検討した．なお吸光度の測定はすべて日立分光光電光度計（EPU-2）によつた．

a　加熱時間　グリコール酸及びNa-CMCがグリコール酸まで分解されて生ずる色調の強さ*は加熱時間に影響

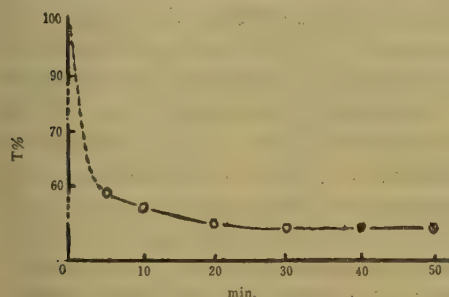



Fig. 1 Effect of heating time on color development of glycolic acid

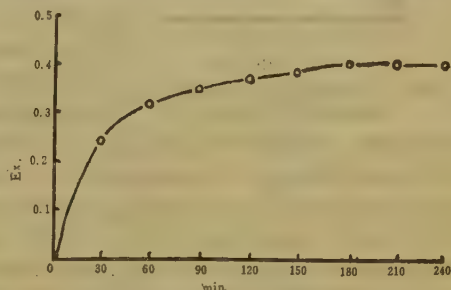



Fig. 2 Effect of heating time on color development of Na-CMC

* 色調の強さはまた試液の濃度で違うから測定は厳密に同一の条件で操作する．試液は測定の都度新製し検量線は一週毎にチェックする．また試液は空気との接触を避け暗所に貯える．

する．これらをFig. 1及びFig. 2に示す通りグリコール酸は30min.，Na-CMCは3.5hrs. で最大となる．

b　妨害物質　ホルムアルデヒド及び他のアルデヒド類は試液と反応し，乳酸あるいは林檎酸は螢光を有する黄色溶液[5]となり，また検液中に多量の糖分などが存在すると硫酸で加水分解する際に炭化され，着色（黒）溶液となつて測定出来ない．従つてNa-CMCを加水分解する際に，液が著しく着色した場合は活性炭で処理した透明な溶液について呈色させることが必要である．

（2）**標準Na-CMCの精製**　Na-CMCの必要量を500cc共栓フラスコにとり，90%メチルアルコール300ccを加えて1～2hrs. 振盪したのち静置して上澄液を傾斜し，更に90%メチルアルコール300ccを加えて振盪し上澄液に食塩，硫酸，アルカリ，グリコール酸の存在を認めなくなつたら内容をガラスフィルターに移し弱く吸引濾過し，残渣は無水メチルアルコールで数回洗つたのち風乾して標準Na-CMCとする．これらのNa-CMCのD.S.及びナフタレンジオール法による検量線を先に報告した操作法[2]に従つて作製した．これをTable 1及びFig. 3に示す．

Table 1.　Degree of Substitution (D. S.) of Standard Na-CMC

St. Na-CMC No.	Ash-Alkarinity	H_2SO_4-MeOH-F	Naphthalenediol
1	0.46	0.45	0.46
2	0.63	0.62	0.63
3	1.11	—	1.11

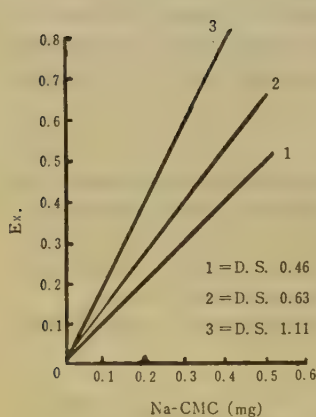



Fig. 3 Calibration curve for standard Na-CMC

（3）**ペクチン質除去剤**　カルシウム塩またはマグネシウム塩はペクチンと結合して不溶性の沈澱を生ずる[6]がNa-CMCはこれらの塩によつて沈澱されない[7]．ペクチン質製品に銅塩沈澱法を応用するとき，水溶性ペクチンは銅塩となつてCu-CMCと一緒に沈澱する．従つて前処理としてペクチンの除去が必要である．著者らは食品中のペクチン除去剤として硝酸カルシウム（$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$），塩化カルシウム（$CaCl_2 \cdot 6H_2O$），硝酸マグネシウム（$Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$），を用いてNa-CMCに対する影響を検討した．ペクチンはアルカリで脱エステル化したのち酢酸で中和し，カルシウム塩の過剰を加えて濾過する[8]．即ち標準Na-CMC（D.S.＝0.63）の希薄水溶液及びこの溶液にペクチン（Citrus）0.1gを添加したものに0.5N水酸化ナトリウム液を加えてpH11.5とし30min. 放置後，30%酢酸液でpH5～5.5とし除去剤の一定量を加えて30min. 放置したのち，ガラスフィルターを用いて吸引濾過する．フィルターをよく水洗し，濾液，洗液を合しこの溶液について定量実験における銅塩沈澱法[3]を行つてNa-CMCの回収率を測定した．結果をTable 2～4に示す通りこれらペクチン除去剤の種類による回収率の差は認められないが，その過剰は約6%程度の減少を示している．これは濾過操作によつて水に不溶性の低エーテル化物が除去され，また過剰の塩類によつてこの低エーテル化物が析出したためであろうと考えられる．ペクチンを添加したNa-CMCの回収率も添加しないものに比して殆んど同じである．即ちペクチンを加えても回収率は低下しない．ペクチンの除去にはカルシウム塩が優れている．またカルシウム塩溶液の添加量は次の根拠から定めることが出来る．無水ウロン酸（Anhydrouronic acid＝AUA）の分子量は176，カルシウムは40.07であるからウロン酸のカルボキシル基に結合したCa pectateのカルシウムは10.204%に相当する．10%硝酸カルシウム液10ccはペクチン約1.4gを沈澱させる．ケチャップ及びジャム中のペクチンは約3%程度と思われる．

Table 2. Effect of $Ca(NO_3)_2$ Reagent on recovery of Na-CMC.

Na-CMC (mg)	10% $Ca(NO_3)_2$ Sol. (cc)	Pectin Added	Na-CMC Found (mg)	Recovery (%)
20	Non	—	20.3	101.5
20	Non*	—	19.7	98.5
20	5	—	19.2	96.0
20	10	—	19.3	96.5
20	15	—	19.1	95.5
20	20	—	18.8	94.0
20	5	0.1	19.4	97.0
20	10	0.1	19.2	96.0
20	15	0.1	19.3	96.5
20	20	0.1	18.8	94.0

* The solution was filtered.

Table 3. Effect of $CaCl_2$ Reagent on recovery of Na-CMC.

Na-CMC (mg)	10% $CaCl_2$ Sol. (cc)	Pectin Added	Na-CMC Found (mg)	Recovery (%)
20	Non	—	20.2	101.0
20	Non*	—	19.5	97.5
20	5	—	19.3	96.5
20	10	—	19.2	96.0
20	15	—	18.8	94.0
20	20	—	18.8	94.0
20	5	0.1	19.2	96.0
20	10	0.1	19.1	95.5
20	15	0.1	19.1	95.5
20	20	0.1	18.9	94.5

* The solution was filtered.

Table 4. Effect of $Mg(NO_3)_2$ Reagent on recovery of Na-CMC

Na-CMC (mg)	20% $Mg(NO_3)_2$ Sol. (cc)	Pectin Added	Na-CMC Found (mg)	Recovery (%)
20	Non	—	19.8	99.0
20	Non*	—	19.4	97.0
20	5	—	19.3	96.5
20	10	—	19.0	95.0
20	15	—	19.1	95.5
20	20	—	18.7	93.5
20	5	0.1	19.2	96.0
20	10	0.1	19.1	95.5
20	15	0.1	18.8	94.0
20	20	0.1	18.9	94.5

* The solution was filtered.

（4）**実験材料**　本実験では市販のケチャップ，ジャム及びマーマレードを用いた．また特に自製したケチャップ及びジャムを材料とした．その製造要領は次の通りである．

A　ケチャップ（a）原料と配合量　トマトピューレー2.0*l*，白砂糖200g，食塩40g，氷酢酸6g，桂皮末2g，蜜柑皮2g，唐辛子1g，ペッパー1g，辛子0.5g，ガリック0.5g，オールスパイス0.5g，ポンソー3R20mg，タートラジン2mg．（b）製法（イ）鮭肉部多く漿肉部の少ない愛知トマトを1週間放置して十分完熟させたものを水洗後，ナイフで除帯しミキサーを用いて破砕する．これを裏濾しして皮，種子を除き二重釜に入れて容積が約6～7割減となるまで煮詰める．4.5kgのトマトからピューレー約2*l*を得る．（ロ）玉葱は細切し少量の水で煮熟する．（ハ）桂皮末，蜜柑皮，唐辛子，ペッパー等の香辛料は少量の水で煮出し，布に入れて圧搾して浸出液を得る．（ニ）ピューレーを鍋に入れ加熱したのち砂糖を加えて溶解させる．これに（ロ），（ハ）及び食塩を順に加えてよくかきまぜ，最後に氷酢酸を加えて火を止め，着色料を加えてよくかきまぜ熱いうちに容器につめて製品とする．これを標準ケチャップとした．

B　りんごジャム　完熟した香気ある国光種を剝皮し除芯したのち，菓肉を細切し，ただちに2％食塩水に浸け，引上げて原料菓の約$^{1}/_{3}$量の水を加えミキサーを用いてよく均質となし，大型の磁製皿上で蒸発濃縮する．内容がやや粘稠となつたとき約7割の砂糖及び少量のペクチンを加えてよくとかしたのち広口ビンに移して冷却する．これを標準ジャムとした．以上の実験材料をTable 5に一括する．

Table 5.　Samples

Sample No.	Sample	Manufacturer	Remark
1	Tomato Ketchup	—	Standard
2	〃	M	Natural
3	〃	K	〃
4	Apple Jam	—	Standard
5	〃	S	Natural
6	Strawberry Jam	N	〃
7	〃	S	〃
8	〃	A	〃
9	Apricot Jam	A	〃
10	〃	Ko	Artificial*
11	Strawberry Jam	Ko	〃
12	〃	F	〃
13	Apricot Jam	F	〃
14	Marmalade	A	Natural

*These jams are imitations made from starch, agar, "mizuame", coloring matter and natural jam.

（5）**検出実験**　検体5～10gを100ccビーカーにとり水30ccを加え水浴上に暫時温めて内容をよくつぶし，0.5N水酸化ナトリウム液10～15ccを加え25～30°で30min.放置したのち30％酢酸液で弱酸性とし，10％硝酸カルシウム液5～10ccをかきまぜながら加える．15min.放置したのち細菌用濾紙（東洋濾紙No.101）で濾過し，濾液の約5ccを栓付の50cc遠沈管にとり塩酸々性メチルアルコール（無水メチルアルコール90ccに濃塩酸10ccを加える）液40ccを加えて20min.放置したのち15min.遠心分離（毎分3000回転）する．上澄液をピペットを用いて棄て，沈澱に80％メチルアルコール液40ccを加えてよく振り同様に遠心して上澄液を棄てる．沈澱はさらに80％メチルアルコールで1～2回遠沈を繰返して糖分及び硝酸イオンを完全に取去る．この沈澱を約10ccの50％硫酸液に溶かして検液とする．この液1～2ccを硬質試験管にとり0.01％ナフタレンジオール硫酸溶液（濃硫酸1*l*に2,7-Dihydroxynaphthaleneの0.1gを加えて溶かし数時間暗所に貯えて最初の黄色が消失してから使用する）20ccを加え，沸騰水浴中で加熱（Fig. 2参照）したとき，同様に処理した試液に対して明らかな深赤紫色を呈すればNa-CMCの存在が確である．上記の実験材料について以上の操作を行つた結果は，いずれも陰性であり，Na-CMCを添加

した検体ではいずれも陽性であつた．この操作法に従うときは0.05％まで確実に検出できる．

（6） **定量実験** ケチャップ，ジャム及びマーマレード等のペクチン質食品中の定量に２法が考えられた．１は検体を脱エステル化しカルシウム塩を加えたのち濾過してペクチンを除去し，濾液について銅塩沈澱法[3]を行う．２は酸性メチルアルコールを加えて遠心分離し，[9]糖，色素，有機酸等を分離除去した残渣について１と同様に処理する．便宜上前者を**直接銅塩法**，後者を**遠沈－銅塩法**と呼ぶ．

前述したように本実験における実験材料からはNa-CMCの存在を認めなかつたので，これら材料に標準Na-CMCの適当量（実際の使用量を想定して約0.5～１％となる如く）を添加し，下記の操作法に従つて回収率を実験した．

A 直接銅塩法 検体２～10g* を200ccビーカーに秤取し水約90ccを加えてよくかきまぜ，0.5N水酸化ナトリウム液30ccを加え，25～30°，30min．放置したのち30％酢酸液で弱酸性（リトマス紙）とし，更に10％硝酸カルシウム液５～10ccをかきまぜながら加えて30min．放置する．これを細菌用濾紙を用いて濾過し，沈澱を濾紙上に移し，温１％硝酸カルシウム液の少量で２～３回洗う，濾紙上の沈澱はもとのビーカーに移し，１％硝酸カルシウム液50ccを加えてよくかきまぜ，再び前の濾紙を用いて濾過し少量の水で洗う（この時の液量は約250ccとする）．この溶液にメチルレッド指示液５～６滴を加え，濃塩酸を滴下して赤色を呈させる．この溶液を１％硫酸銅液75cc無水メチルアルコール50cc及び濃塩酸0.5～1.0ccを混合した500ccビーカー中にかきまぜながら少量ずつ加え，前のビーカーは１％硫酸銅液25ccでよく洗つて混合液に加える（この時のpHは約2.5とし高い時は濃塩酸，低い時は３％アンモニア水で調整する）．この混合液に３％アンモニア水を注意してかきまぜながら加えpH4.0～4.1にする．この時Na-CMCは綿状の沈澱となつて現われる．電極を洗い沈澱は数時間放置して沈着させる．（泡立つときは少量のエーテルを加えて消し，沈着が困難の時は一夜放置する）．上澄液は傾斜法に従いガラスフィルターに移し，最後に沈澱をフィルターに移す．ついで無水メチルアルコール．エーテルの順で洗う**．この沈澱をガラス棒ですりつぶし温50％硫酸液の少量ずつ数回加えてその都度よくすりつぶして吸引する．完全にとけたのち50％硫酸液で洗い沪液，洗液は100ccメスフラスコに移して一定容とする．この検液0.5～2.0ccを流出口をつけた２×20 cmの栓付硬質試験管に精確に秤り，ビューレットから呈色試液（調製後少くも数時間放置した2,7-Dihydroxynaphthaleneの0.01％硫酸液）20ccを加え，栓をして沸騰水浴中に3.5hrs．加熱し直ちに冷却し，水10ccを入れた50ccメスフラスコに注意して移し，試験管は水５ccずつ３回洗滌してフラスコに加え，室温まで冷却後水を加えて一定容とする．呈色試液20ccを同様に処理した液を対照として日立分光光電光度計を用いて530mμにおける吸光度を測定し，これを標準Na-CMCから得られた検量線（Fig. 3）からその含量を求めた．結果をTables ６～８に示す．

B 遠沈－銅塩法 検体２～10g，を栓付50cc遠沈管に秤取し，塩酸々性メチルアルコール液あるいは硫酸々性メチルアルコール液（無水メチルアルコール90ccに濃硫酸３cc及び水７ccを加える）30～40ccを加え，栓をしてよくふり20min．放置したのち，20min．遠沈する（毎分3000回転），上澄液は注意してピペットで吸上げて棄てる．沈澱には80％メチルアルコール液30～40ccを加えてよくふり，同様に処理して上澄液を棄てる，この操作をさらに１～２回繰返したのち沈澱した残渣に0.5N水酸化ナトリウム液30ccを加えてよくふり，温浴中に30min．放置したのち200ccビーカーに定量的に移し，遠沈管は少量の水で数回洗い残渣をビーカーに移す，（洗液の総量は約90ccとする）．これを30％酢酸液で弱酸性（リトマス紙）とし，以下Aと同様に操作する．結果をTables ９～11に示す．

---

* 検体の採取量はNa-CMCの含有量によつて調節する．測定液の好適濃度は検液１cc中0.2～0.3mg（D.S.≒0.60として，Fig. 3参照）である．

** この沈澱を乾燥，秤量すればCu-CMCの重量が知れる．もしD.S.が既知のときは直ちにその含量が計算出来るが，未知の場合はCu-CMC中の銅量を測定してD.S.を計算する．

本実験では考察で述べる様にCu-CMC以外の銅塩が混在し，この定量法は失敗した．

Table 6. Recovery of Added Na-CMC (D.S. =0.46)

Sample No.	Sample (g)	Na-CMC Added (mg)	Na-CMC Found (mg)	Recovery (%)
1	10	51.3	47.9	93.37
2	10	50.6	47.0	92.89
3	10	51.0	47.9	93.92
4	5	53.2	49.0	92.11
5	5	49.6	44.9	90.52
6	5	53.1	48.9	92.09
7	5	50.7	45.7	90.14
8	5	51.3	47.6	92.79
9	5	51.6	47.5	92.05
10	5	51.0	47.9	93.92
11	5	53.2	51.2	96.24
12	5	52.7	48.6	92.22
13	5	48.8	46.3	94.88
14	10	51.4	49.3	95.91

Table 7. Recovery of Added Na-CMC (D.S. =0.63)

Sample No.	Sample (g)	Na-CMC Added (mg)	Na-CMC Found (mg)	Recovery (%)
1	10	55.3	52.4	94.76
2	10	57.6	53.4	92.71
3	10	54.1	50.9	94.09
4	5	50.8	46.7	91.93
5	5	52.7	47.7	90.55
6	5	52.9	49.5	93.57
7	5	50.6	45.8	90.51
8	5	51.8	48.4	93.44
9	5	49.2	45.1	91.67
10	5	49.7	47.0	94.57
11	5	48.6	46.5	95.68
12	5	50.8	47.4	93.31
13	5	51.7	49.4	95.55
14	10	53.4	51.4	96.25

Table 8. Recovery of Added Na-CMC (D.S. =1.11)

Sample No.	Sample (g)	Na-CMC Added (mg)	Na-CMC Found (mg)	Recovery (%)
1	10	31.6	30.2	95.57
2	10	30.7	28.7	93.49
3	10	30.7	29.0	94.46
4	5	32.6	30.1	92.33
5	5	32.0	29.3	91.56
6	5	31.8	29.7	93.40
9	5	30.9	28.5	92.23
11	5	31.4	30.1	95.86
12	5	29.8	29.9	93.62
14	10	32.3	31.2	96.90

Table 9. Recovery of Added Na-CMC (D.S. =0.46)

Sample No.	Sample (g)	Na-CMC Added (mg)	Na-CMC Found (mg)	Recovery (%)
1	10	51.5	41.4	80.39
2	10	50.6	41.1	81.23
3	10	53.2	42.5	79.89
4	5	49.6	40.5	81.65
5	5	50.5	42.3	83.76
6	5	56.3	47.2	83.84
7	5	48.2	38.7	80.29
8	5	51.7	41.2	79.69
9	5	50.8	40.7	80.12
10	5	51.5	43.3	84.08
11	5	50.6	41.8	82.61
12	5	48.8	40.0	81.97
13	5	53.6	44.9	83.77
14	10	51.7	43.4	83.95

Table 10. Recovery of Added Na-CMC (D. S. =0.63)

Sample No.	Sample (g)	Na-CMC Added (mg)	Na-CMC Found (mg)	Recovery (%)
1	10	57.7	47.5	82.32
2	10	46.3	37.3	80.56
3	10	51.4	43.0	83.66
4	5	48.6	40.4	83.13
5	5	44.5	36.7	82.47
6	5	53.1	43.1	81.17
7	5	51.7	43.2	83.56
8	5	52.8	42.6	80.68
9	5	55.4	45.0	81.23
10	5	51.2	43.4	84.77
11	5	48.8	40.6	83.20
12	5	52.3	43.7	83.56
13	5	53.1	44.8	84.37
14	10	49.3	42.1	85.40

Table 11. Recovery of Added Na-CMC (D. S. =1.11)

Sample No.	Sample (g)	Na-CMC Added (mg)	Na-CMC Found (mg)	Recovery (%)
1	10	30.2	25.2	83.44
2	10	31.6	25.8	81.65
3	10	31.7	26.3	82.97
4	5	33.2	27.3	82.23
5	5	31.6	25.4	80.38
6	5	28.7	22.8	79.44
7	5	29.9	24.4	81.61
8	5	30.7	25.1	81.76
9	5	31.4	25.4	80.89
10	5	32.5	27.1	83.38
11	5	31.8	26.7	83.96
12	5	30.7	25.7	83.71
13	5	29.3	25.0	85.32
14	10	31.6	27.3	86.39

考察とむすび

本実験に実験材料として使用した市販品からは予想に反していずれもNa-CMCを検出しなかつた．

この実験では実際に添加された場合を想定して，検出実験及び定量実験を実施した．食品に添加されたNa-CMCを定量する場合はその食品から純粋に抽出し，そのD.S.を測定することが先決であるが本実験では一応この目的を除外して，D.S.既知の添加実験を行つた．これは一面我が国の製品のD.S.は0.5～0.7の範囲にあり[2]，平均値の0.6をファクターとして採用しても大差ないとの考慮から出発したものである．誤差の原因はむしろその定量操作の煩雑さにあると考えられる．しかしながら純粋のNa-CMCについてのD.S.の測定は当然要求される問題であるので，以後の実験において検討して行く心算である．本実験はペクチン質食品に対して行い，ペクチン除去剤として硝酸カルシウムの小過剰を使用し，溶液から比較的純粋に抽出分離する操作として銅塩沈澱法を採用し，これをナフタレンジオール法によつて比色定量した．直接銅塩法においては回収率はいずれも90%を超え，定量法として充分採用出来るものと思われる．遠沈－銅塩法の回収率は80%程度であるがこれは主として酸性メチルアルコール液による遠沈操作中の損失によるものであると思われる．標準Na-CMCについて行つた検出実験における上澄液から顕著なグリコール酸反応が現われるところから見て明らかであり，酸の濃度，遠沈の条件及び操作についてはなお検討を要する．これらのいずれの方法にしてもCu-CMCとして純粋に沈澱させる目的は失敗した．即ち溶液中に溶存している蛋白質あるいは銅塩と反応性の他の物質がCu-CMCと一緒に沈澱しこれを乾燥した重量からD.S.を測定することは無意味である．純粋のCu-CMCとして沈澱させることは今後の大きな課題である．ペクチン除去剤としては他に酢酸カルシウム，硫酸マグネシウム等あり，また酵素（ペクチナーゼ）の使用も考えられ，アンスロン（9.10-Dihydro-9-keto-anthrone)[10]によるNa-CMCの定量法，食品別による定量法等については今後実験を継続する予定である．

本実験終了後入手した報告[11]によれば，ケチャップ中のNa-CMCの検出において著者らと同様に，ナフタレンジオール試薬を用いている．

文　献

1) 厚生省編：食品衛生研究 2，No.4 (1952)
2) 藤井，原田：本誌，75，　(1957)
3) Conner, A. Z. and Eyler, R. W. : *Anal. Chem.*, 22, 1129 (1950)
4) Eyler, R. W. *et al.*, : *Ibid.*, 19, 24 (1947)
5) Feigl, F. : "Spot Test" **Vol. Ⅱ**, P. 249 (1954)
6) Carre, M. H. and Haynes, D. : *Biochem. J.*, 16, 66 (1922)
7) Hercules Pamphlet "Hercules CMC, Water Soluble Cellulose Gum" Printed U. S. A.
8) McCready, R. M. and McComb, E. A. : *Anal. Chem.*, 24, 1630, 1986 (1952)
9) 坂上，白石：国立公衆衛生院研究報告 4，No.4，7 (昭30)
10) Black, H.C., Jr. : *Anal. Chem.*, 23, 1792 (1951)
11) Strange, T. E. : *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, 40, 482 (1957)

Summary

A method for the detection and determination of sodium carboxymethylcellulose in ketchup, jam, and marmalade has been described. The procedure for the detection involves treating the sample with Ca $(NO_3)_2$ to remove the pectins, isolating carboxymethylcellulose in HCl-methanol, and detecting it with 2,7-naphthalenediol reagent. The procedure for the determination involves treating the sample with Ca $(NO_3)_2$ to the pectins, isolating carboxymethylcellulose by the copper salt precipitation methed and determining it with the same reagent spectrophotometrically. In the experiment, carboxymethylcellulose of known degree of substitution was added to ketchup, jam, and marmalade and analysed by the above method. Results are shown in Table 6－8. Recoveries were 90% or better.

Received June 18, 1957

バニリンおよびイソバニリンのポーラログラフ的還元について

藤 井 正 道, 佐 藤 寿

Polarographic Reductions of Vanillin and Isovanillin.

Masamichi FUJII and Hisashi SATŌ

まえがき

一般にアルデヒド基を有する化合物はポーラログラフによつて還元波を示すことが知られている[1]，バニリンのポーラログラフィーについてはWinkel等[2]，Adkins等[3]，Semerano等[4]，Brdicka,[5] Dezelic等[6]，Santavy[7] および佐藤[8] 等の諸報告がある．又Pasternak[15] はアルデヒド基をもつ化合物の還元機構を定電位電解法を用いて，即ち酸性側では1電子還元の2量体を生じ，中性，アルカリ性側では2電子還元でアルコールを生ずることを実証している．イソバニリンについては佐藤[8] の報告がある．著者は高濃度のアルコール中において支持電解質として臭化ナトリウムを用いて標記両化合物のポーラログラフ的挙動についていささかの結果がえられたので以下これについて報告する．

実験の部

装 置 島津製写真記録式ポーラログラフ（検流計感度5.00×10^{-9}A/1mm./1m）．水銀滴下電極は h=51.5cm open circuit にて，t=3.00sec, $m=2.41\times10^{-3}$g sec^{-1}, $m^{2/3}t^{1/6}=2.159$．電解液の粘度（η）および密度はそれぞれオストワルド粘度計およびスプレンゲルで測定，標記両化合物の密度はピクノメータで測定，電解液内部抵抗は500Ω以下であるからiR-dropは無視出来た．

材 料 バニリン（mp. 82.5°C），イソバニリン（mp. 116°C）の各純品，支持電解液は臭化ナトリウムの2.5*M*水溶液，緩衝液はBritton-Robinson氏の処法の液，極大抑制剤は1％ゼラチン水溶液．

操 作 各化合物とも10.0*mM* のアルコール溶液5*ml*＋緩衝液5*ml*＋2.5*M*臭化ナトリウム溶液5*ml*⟶全量をアルコールで50*ml*（化合物の濃度1*mM*の場合）として電解液をつくり，この液5*ml*に対してゼラチン液1滴を加え，窒素ガスで溶存酸素を追い出した後ポーラログラフィーを行う．波高測定法は Kolthoff-Lingane 法による．

結果および考察

バニリンおよびイソバニリンのポーラログラムをFig. 1，2に示す．

何れもpH3.5では1段波で，それ以上のpHの波高の約半分である，pH5.5～7.0でバニリンは略等高な2段波を示すが，イソバニリンでは1段波を示している．pH9.5～12.5でバニリンは還元波を殆んど消失し支持電解質の波が現われているが，イソバニリンでは消失することなく1段波を呈している．両化合物の半波電位はpH3.5～5.5では略同様であり，pH7.0以上ではバニリンは還元波を消失するので比較は出来ない．バニリンの還元波消失はアルコール濃度が高い場合アルカリ金属イオンが増加するに従つて消失は著しくなる様に見受けられ，他の支持電解質例えば一ヨウ化カリウム，臭化テトラメチルアンモニウムを用いた場合も略同様な結果がえられる．これらの原因については不明である．つぎに両化合物の定量条件はバニリンについてはpH3.5および7.0，イソバニリンについてはpH3.5およびpH7.0～10.5の還元波は波形が良好であるから定量に応用出来，それぞれ濃度0.1～1.0*mM*で濃度と波高は比例する．

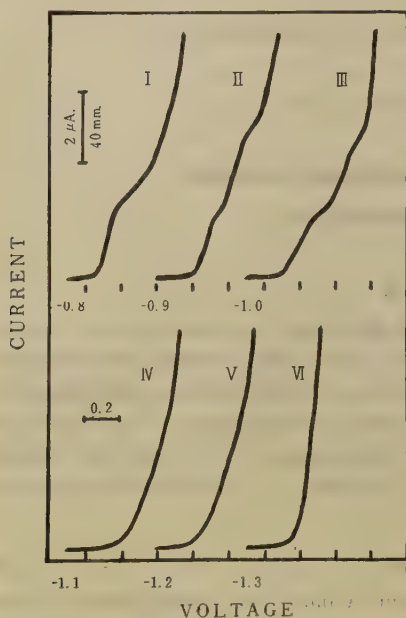



Fig. 1. Polarograms of Vanillin
I. pH3.5, II. pH5.5, III. pH7.0
IV. pH9.5, V. pH10.5, VI. pH12.5:
C., 1.0*mM*, S.,1/10.

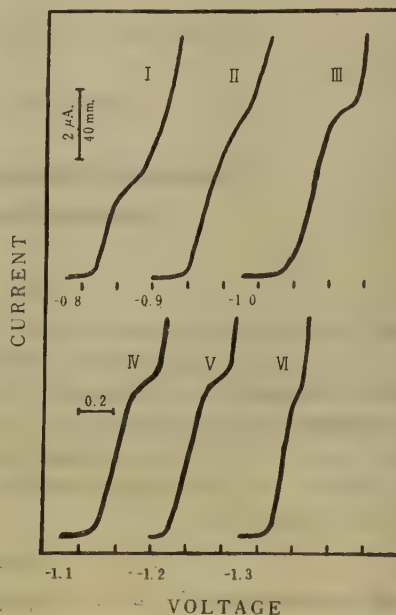



Fig. 2. Polarograms of Isovanillin
I. pH3.5, II. pH5.5, III. pH7.0
IV. pH9.5, V. pH10.5, VI. pH12.5:
C., 1.0*mM*, S.,1/10.

両化合物の波高は水銀柱の変化に対して拡散支配であることを示しているから，水銀滴下電極における電子数nを求めた結果等をTab. 1に示す.

Tab. 1. Polarographic Behavior of Vanillin* and Isovanillin** in 80 Per Cent Ethanol

Compound	pH	-E1/2 (vs. S. C. E,), V.	Id***	Electron n
In 0.25 *M* NaBr, 0.04*M* Britton-Robinson Buffer, 0.014% Gelatin-80% Ethanol.				
Vanillin	3.5	1.22	1.13	1.1
	5.5	1.38	0.97	0.9
		1.54	1.05	1.0
	7.0	1.48	0.85	0.8
		1.75	1.04	1.0
	9.5,a) 10.5,a) 12.5b)		—	—
Isovanillin	3.5	1.21	1.20	1.2
	5.5	1.38	2.08	2.0
	7.0	1.59	2.11	2.0
	9.5	1.61	1.94	1.9
	10.5	1.62	1.93	1.9
	12.5	1.73	1.79	1.7

* mp. 82. 5°C, sp. gr. 1.056. Soln. viscosity, $\eta=19.88\times10^{-8}$dyne sec cm^{-2}, Diffusion Coefficient, $D=2.84\times10^{-6}$ cm^2 sec^{-1} at 25°C.

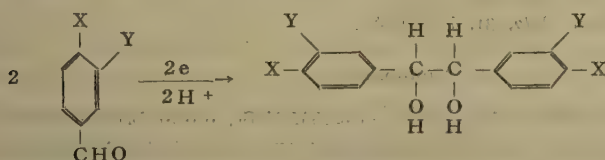
** mp. 116°C, sp. gr. 1.196. $\eta=19.91$, $D=2.96$.

*** $id/Cm^{2/3}t^{1/6}$.　$m^{2/3}t^{1/6}=2.159$.

a) Very slight wave. b) No wave.

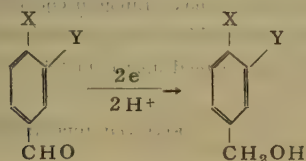
Tiemann[9]はバニリンをナトリウムアマルガムで還元し Hydrovanilloin と Vanillylalcohol をえている，又 Voorhees等[10] Carothers等[11] Rosenmund等[12]は何れも触媒を用いて水素還元を行い上記化合物をえている．又 Law[13]はバニリンを緩和に電解還元して Hydrovanilloin をえている．島[14]は水銀を用い電解還元を行いVanillylalcohol をえている，以上の結果と本ポーラログラフィーの結果およびベンズアルデヒドの還元機構を説明した Pasternak[15]等の結果を綜合してバニリンおよびイソバニリンの還元機構を推定した．これをつぎに示す．

In acid soln. :

$$2\ \text{X-C}_6\text{H}_3(\text{Y})\text{-CHO} \xrightarrow[2H^+]{2e} \text{X-C}_6\text{H}_3(\text{Y})\text{-CH(OH)-CH(OH)-C}_6\text{H}_3(\text{Y})\text{-X}$$

(X＝OH, Y＝OCH_3, Vanillin)　(X＝OH, Y＝OCH_3, Hydrovanilloin)

(X＝OCH_3, Y＝OH, Isovanillin)　(X＝OCH_3, Y＝OH, Hydroisovanilloin)

In neutral or alkaline soln. :

$$\text{X-C}_6\text{H}_3(\text{Y})\text{-CHO} \xrightarrow[2H^+]{2e} \text{X-C}_6\text{H}_3(\text{Y})\text{-CH}_2\text{OH}$$

(X＝OH, Y＝OCH_3, Vanillylalcohol)

(X＝OCH_3, Y＝OH, Isovanillylalcohol)

総　　括

(1) バニリンおよびイソバニリンのポーラログラフィーを行つた結果，バニリンについてはpH3.5～7.0で1～2段波がえられ，それ以上のpHでは還元波は消失した，イソバニリンについてはpH3.5～12.5で常に1段波を示した．半波電位は両化合物とも酸性側では速かに，中性およびアルカリ性側では徐々に何れも負側え移動した．両化合物とも中性以上の波高は酸性側の波高の約2倍を示した．両波高とも前記のpHでは濃度に比例した．

(2) Stokes−Einstein 式より求めた拡散係数を Ilkovic 式に適用して求めた電子数より両化合物の還元機構は Pasternak の報告したベンズアルデヒドの機構と略同様で，即ちバニリンおよびイソバニリンは酸性側では1電子還元で Hydrovanilloin あるいはHydroisovanilloin を，中性およびアルカリ性側では2電子還元で Vanillylalcohol あるいは Isovanillylalcohol を生じているものと推定された．

本研究に際し粘度測定に助力された菊池寛君に謹謝する．

文　　献

1) Kolthoff, I. M., Lingane, J. J, : "Polarography," 2nd Ed., Vol. 2, 652, 678 (1952), (Interscience Publishers Inc., New York).

2) Winkel, A., Proske, G. : *Ber.*, 69, 1917 (1936).

3) Adkins, H., Cox, F. W. : *J. Am. Chem. Soc.*, 60, 1151 (1938).

4) Semerano, G., Chisini, A. : *Gazz. chim. ital.*, 66, 510 (1936).

5) Brdička, R. : Čas čes lék., 58, 38 (1945); *Ibid.* : *Chem. Listy*, 39, 35 (1945).
6) Deželic, M., Herak, J. : *Kem. Vjestnik*, 15/16, 7 (1941/42).
7) Šantavý, F. : *Collection Czechoslov. Chem. Communs.*, 14, 145 (1949).
8) Satō, H. : THIS BULLETIN, 74, 33 (1956) ; *C.A.*, 51, 7647 f (1957).
Ibid. : *Japan Analyst*, 6, 164 (1957).
9) Tiemann, F. : *Ber.*, 8, 1125 (1875); *Ibid.* : 9, 415 (1876).
10) Voorhees, V., Adams, R. : *J. Am. Chem. Soc.*, 44, 1404 (1922) ; *C.A.*, 16, 2500 (1922).
11) Carothers, W. H., Adams, R. : *J. Am. Chem. Soc.*, 46, 1680 (1924) ; *C.A.*, 18, 2505 (1924).
12) Rosenmund, K. W., Jordan, G. : *Ber.*, 58, 162 (1925).
13) Law, H. D. : *J. Chem. Soc.*, 89, 1515 (1906) ; *C.*, 78, (I) 339 (1907) ; *C.A.*, 1, 173 (1907).
14) Shima, G. : *Mem. Coll. Sci. Kyoto Univ.*, 11, [A] 420 (1928) ; *C.A.*, 23, 2371 (1929).
15) Pasternak, R. : *Helv. Chim. Acta*, 31, 755 (1948).

Summary

Polarographic behaviors of vanillin and isovanillin in 0.25*M* NaBr, 0.04*M* Britton-Robinson buffer, 0.014% gelatin in 80% alcoholic soln. have been investigated. The polarographic determination of each of the substances was possible since their wave heights were proportional to the concentration in the pH range of 3.5, 7.0 (vanillin), 3.5, 7.0~10.5 (isovanillin) and concentration range of 0.1~1.0*mM*.

With an increase in pH value, the half-wave potentials of both of these substances were shifted to the negative side. The diffusion coefficient calculated from the Stokes- Einstein equation was applied to the Ilkovic equation to determine the electron number, from which was confirmed the mechanism of reduction at the dropping mercury electrode: and the result agreed approximately with the report of Pasternak.

Received June 18, 1957.

有機化合物のポーラログラフによる研究（第7～10報）*

佐藤　寿

Polarographic Studies of Some Organic Compounds. (VII～X)*

Hisashi SATŌ

（第7報）クリソイジンのポーラログラフィー

VII. Polarography of Chrysoidine

まえがき　アゾ化合物はポーラログラフによつて酸，中性およびアルカリ性の何れにおいてもヒドラゾ化合物になる2電子を含む還元波を呈する[1,5]ことが知られている．又置換されているアゾ化合物，即ちパラアミノアゾベンゼン[2]，メチルレッド[3]，メチルオレンジ[4]等はpHによつて還元波は複雑に分離するが，上記のアゾ化合物の場合とほぼ同様であるとみなされている．ところが最近Laitinen等[6]は50％アルコール中でパラジメチルアミノアゾベンゼンのポーラログラフ的および電量的研究を行つた結果，酸性側では4電子を含むアミンえの還元機構であり，強アルカリ性側では2電子を含む不安定なヒドラゾ化合物えの還元機構であると報告している．著者はアゾ色素であるクリソイジンについて80％アルコール中においてポーラログラフィーを行つた処，いくらかの知見をえたので以下これを報告する．

実験の部

装　置　島津製写真記録式ポーラログラフ（検流計感度 5.00×10^{-9}A/mm./m.），半波電位は飽和甘汞電極（S.C.E.）25°Cで測定し，電解液の見掛のpHはガラス電極pH計で測定した．水銀滴下電極は $t=3.00$sec，$m=2.41\times10^{-3}$g　sec^{-1}，$m^{2/3}t^{1/6}=2.159$である．電解瓶は25±0.5°Cの恒温箱に置き窒素ガスを10分以上通じて酸素を除去した．電解液の粘度および密度は25±0.1°Cの恒温水槽でオストワルド粘度計ならびにスプレンゲルを用いて測定し，試料の密度はピクノメータで測定した．電解液の内部抵抗は500Ω以下であるから iR－drop は無視した．

材　料　クリソイジン（mp. 117°C）．アルコールおよび水銀は何れも精製して使用．支持電解液は臭化ナトリウムの2.5*M*水溶液，緩衝液はBritton－Robinson緩衝[7]，極大抑制剤は1％ゼラチン水溶液．

操　作　緩衝液5*ml*＋2.5*M*臭化ナトリウム溶液5*ml*＋10.0*mM*試料アルコール溶液5*ml*⟶アルコールで全量を50*ml*（試料濃度1*mM*の場合）として電解液を製した．この液5*ml*に対してゼラチン液1滴を加え窒素ガスを通じた後，pH3.5～12.5の各電解液についてポーラログラフィーを行つた．波高測定はKolthoff－Lingane法[8]に従つて求めた．

結果および考察

ポーラログラムに対するpHの影響　pH3.5～12.5緩衝液中におけるクリソイジンのポーラログラムをFig. 1に示す．

pH3.5において還元波は極大気味の第1段波とそれに続く極くかすかな第2段波を示し，pH5.5では明瞭な第1段波につづいて小さな第2段波を有している，pH7.0では還元波は複雑になり，即ち小さな第1段波につづいて第2段波と不明瞭な第3段波を示す，pH9.5では還元波は第1段波と不明瞭な第2段波を示し，pH10.5, 12.5の場合もpH9.5に略同様な還元波を示している．何れの半波電もpHの増加に従つて負側え移動しているがその移動状態は酸性側では速かにアルカリ性側では徐々である．波高はpH3.5, 5.5がその他のpHの波高の約2倍で，pH7.

*Part I～VI, Satō, H.: *Japan Analyst*, 6, 81, 164, 549 (1957).

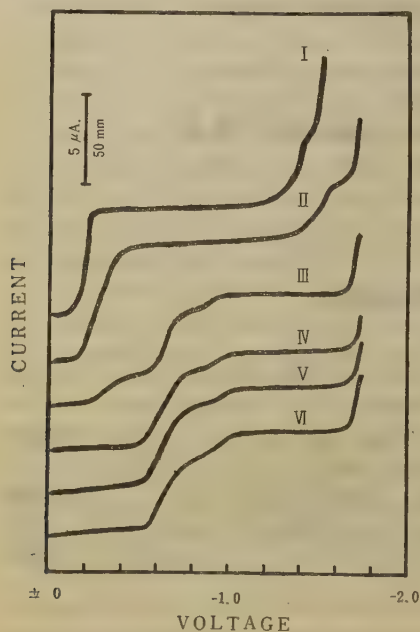



Fig. 1. Polarograms of Chrysoidine
I. pH 3.5, II. pH 5.5, III. pH 7.0, IV. pH 9.5, V. pH 10.5, VI. pH 12.5: C., 1.2 *mM*, S., 1/20.

0, 9. 5, 10. 5, 12. 5は皆略等高である．pH7.0附近よりpHを増すに従つて電解液は黄色より次第に赤色を呈して来ることより酸性およびアルカリ性においてクリソイジンの化学構造的変化が期待されるが，これらはクリソイジンのポーラログラムの上に現われている．

定量条件 Fig. 1に示した通りpH7.0の還元波の第1，第2段波およびpH9.5，10.5，12.5の第1段波は不明瞭で何れも定量に適さないが，pH 7.0の第3段波およびpH9.5，10.5, 12.5の第2段波は定量可能であるが再現性が悪い，最適の還元波はpH 3.5，5.5の第1段波で，波形および再現性良好で濃度1.0～0.1*mM*で波高は濃度と比例し定量出来る．

還元機構 クリソイジンの波高即ち限界電流が拡散支配であるかどうか水銀柱の高さと波高との関係をTab. 1に示す．

Tab. 1. Effect of Mercury Column Height on id of Chrysoidine*

Mercury Column (h), cm.	id, μA.	$idh^{-1/2}$
56.5	5.47	0.73
51.5	5.23	0.73
46.5	4.96	0.73
41.5	4.79	0.75

* In 1 *mM* chrysoidine, 0.25*M* NaBr, 0.04 *M* Britton−Robinson buffer, 0.014% gelatin−80% ethanol, pH3.5. $m^{2/3}t^{1/6}=2.159$.

Tab. 1より同化合物の限界電流は拡散支配であると認められる．なおStokes−Einstein式[9]：

$$D=\frac{2.96\times10^{-7}}{\eta\ (Vm)^{1/3}}cm^2\ sec^{-1}\ (25°C)$$

D＝溶液内における物質の拡散係数．

η＝溶液の粘度，dyne sec cm.$^{-2}$

Vm＝分子容，分子量/密度．

上式よりクリソイジンの拡散係数を求めた結果

$D=2.95\times10^{-6}$ cm^2 sec^{-1}を得，次にIlkovic式[10]：

$n=id/607\ D^{1/2}\ Cm^{2/3}t^{1/6}$

にDおよびポーラログラフィーからえられた値を上式に代入して還元機構に要する電子数nを求めた．以上の結果を一括してTab. 2に示す．

クリソイジンの母体であるところのアゾベンゼンの還元機構についてVolpi[5]は次の如く説明している．

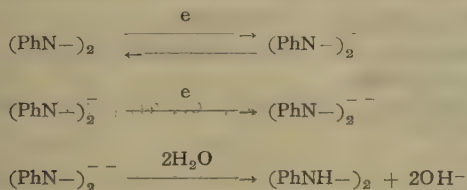
Tab. 2. Polarographic Behavior of Chrysoidine* in 80 Per Cent Ethanol

pH	−E1/2 (vs. S. C. E), V.	Id**	Electron n
In 0.25*M* NaBr, 0.04*M* Britton-Robinson Buffer, 0.014% Gelatin-80% Ethanol.			
3.5	0.40	2.25	2.2
	1.59	1.74	1.7
5.5	0.45	2.61	2.5
	1.70	1.20	1.2
7.0	0.51	0.59	0.6
	0.83	1.29	1.2
	1.07	0.36	0.4
9.5	0.81	1.49	1.4
	1.08	0.63	0.6
10.5	0.82	1.50	1.4
	1.09	0.72	0.7
12.5	0.83	1.32	1.3
	1.14	0.67	0.6

*mp. 117°C, sp. gr. 1.779. Soln. viscosity, $\eta=19.31\times10^{-3}$ dyne sec cm^{-2}., Diffusion coefficient, $D=2.95\times10^{-6}$ cm^2 sec.$^{-1}$ at 25°C.
**$id/Cm^{2/3}\ t^{1/6}$. $m^{2/3}\ t^{1/6}=2.159$.

$$(PhN-)_2 \underset{}{\overset{e}{\rightleftarrows}} (PhN-)_2^-$$

$$(PhN-)_2^- \xrightarrow{e} (PhN-)_2^{--}$$

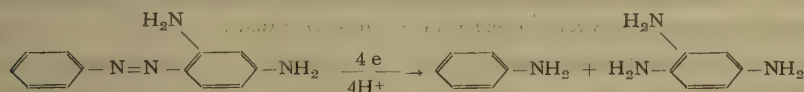
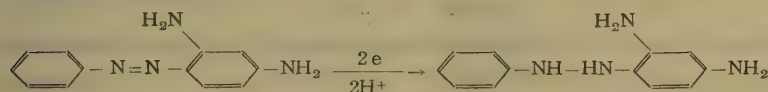
$$(PhN-)_2^{--} \xrightarrow{2H_2O} (PhNH-)_2 + 2OH^-$$

又Laitinen等[6]はパラジメチルアミノアゾベンゼンについて酸性側では n≒4，アルカリ性側ではn≒2の還元機構であるとのべている．クリソイジンの場合にはTab. 2に示した通りpH3.5, 5.5ではn≒4，pH7.0, 9.5, 10.5, 12.5ではn≒2であるから明らかに後者の還元機構であると考えられる．又クリソイジンの母体であるところのアゾベンゼンの化学的還元を行うとき，酸性還元剤ではアニリン，アルカリ性還元剤ではヒドラゾベンゼンを生ずることが知られている[11]，クリソイジンについてはRay等[12]はアルコール中で冷却しながら活性アルミニウムを用いて還元し，アニリンと1, 2, 4－トリアミノベンゼンをえている．以上の結果より水銀滴下電極におけるクリソイジンの還元機構は次式の如く推定される．

In acid soln.：

$$C_6H_5-N=N-C_6H_3(NH_2)-NH_2 \xrightarrow[4H^+]{4e} C_6H_5-NH_2 + H_2N-C_6H_3(NH_2)-NH_2$$

In neutral or alkaline soln.：

$$C_6H_5-N=N-C_6H_3(NH_2)-NH_2 \xrightarrow[2H^+]{2e} C_6H_5-NH-HN-C_6H_3(NH_2)-NH_2$$

総　括

(1)　クリソイジンの還元波は酸性側では明瞭な第1段波とそれにつづく小さな第2段波，中性側では複雑な3段波，アルカリ性側では明瞭な第1段波につづく不明瞭な第2段波．波高は酸性側は中性，アルカリ性側の約2倍の高さを示した．半波電位は酸性側では速かにアルカリ性側では徐々に何れも負側え移動した．本法で定量を行うにはpH3.5～5.5附近が最適であると認められる．

(2)　Stokes－Einstein式よりクリソイジンの拡散係数，$D=2.95\times10^{-6}$ cm^2 sec.$^{-1}$ (25°C) をえ，Ilkovic式より電子数nを求めた結果，水銀滴下電極におけるクリソイジンの還元機構は，酸性側ではアニリンおよび1, 2, 4－トリアミノベンゼン，中性およびアルカリ性側では2, 4－ジアミノヒドラゾベンゼンえの還元であると推定される．

本研究に際して種々御高配を戴いた療品部長藤井正道博士，粘度測定に助力された菊池寛君に謹謝する．

文　献

1) Shikata, M., Tachi, I.：*Mem. Coll. Agr. Kyoto Imp. Univ.*, 17, 45 (1931).
Tachi, I.：*ibid.*, 40, 1, 11 (1937); 42, 1 (1938).
2) Tachi, I.：*ibid.*, 29, 1 (1934).
3) Pittoni, A.：*Ricerca sci. e ricostruz.*, 17, 1396 (1947); *C. A.*, 43, 7368h (1949).
4) Pittoni, A.：*Atti soc. med.-chir. Padova*, 25, 125 (1947); *C. A.*, 43, 7835g (1949).
5) Volpi, A.：*Gazz. chim. ital.*, 77, 473 (1947); *C. A.*, 42, 3346g (1948).
6) Laitinen, H. A., Kneip, T. J.：*J. Am. Chem. Soc.*, 78, 736 (1956).
7) Britton, H. T. S., Robinson, R. A.：*J. Chem. Soc.*, 1456 (1931). Müller, O. H.："The Polarographic Method of Analysis", 194 (1951), (Chem. Education Publishing Co., Easton Pa.).
8) Kolthoff, I. M., Lingane, J. J.："Polarography", 2nd Ed., Vol. 1, 64 (1952), (Interscience Publishers Inc., New York).
9) Kolthoff, Lingane：*ibid.*, 56 (1952).

10) Ilkovic, D. : *Collection Czechoslov. Chem. Communs.*, 6, 498 (1934).
11) Hoffman, A. W. : *Proceeding Royal Soc.*, 12, 576 (1863); *Jahresbericht*, 424 (1863), Biehringer, J., Bush, A. : *Ber.*, 36, 331 (1903).
12) Ray, A. C., Dutt, S. : *J. Indian Chem. Soc.*, 5, 103 (1928); *C.*, 99 (I) 2371 (1928); *C. A.*, 22, 4508 (1928).

（第8報）o-クロルマーキュリフェノールのポーラログラフィー

VIII. Polarography of o-Chloromercuriphenol

まえがき　有機水銀化合物は概して強い殺菌力を有し，その中のある化合物，例えば酢酸フェニル水銀，Thiomersalate 等は実際医薬品として広く用いられている．酢酸フェニル水銀のポーラログラフィーに関しては Page 等[1] Benesch等[2]，Vojíř[3]，梶村等[4]および佐藤[5]の報告があり，何れも酸性，中性，アルカリ性で略等高の2段波を生ずるとのべ，Thiomersalate についてはPage 等は略等高の2段波を，Benesch 等は1段の酸化波と2段の還元波との何れも略等高な3段波がえられたと報告している．標題の化合物のポーラログラフィーについては未だ報告は見当らない．そこで著者は本化合物のポーラログラフィーを実施したところ次の如き結果をえたので，以下これの概要をのべる．

実験の部

装　置　第7報に準ずる．$m^{2/3}t^{1/6}=2.218$. 電解液の内部抵抗は500Ω以下であるからiR dropは無視した．

材　料　o-クロルマーキュリフェノールはWhitmore等[6] の方法で合成した後，アルコールで数回再結晶した純品（mp. 150°C）を使用した．以下第7報に準ずる．

操　作　第7報に準ずる．

Fig. 1. Polarograms of o-Chloromercuriphenol
I. pH 3.5, II. pH 5.5, III. pH 7.0, IV. pH 9.5, V. pH10.5, VI. pH12.5 : C., 1.0*mM*, S., 1/20.

結果および考察

ポーラログラムに対する pH の影響　pH3.5～12.5緩衝液中におけるo-クロルマーキュリフェノールのポーラログラムをFig. 1に示す．

pH3.5～12.5において還元波は常に明瞭な2段波を示す．第1段波の半波電位はpH3.5～9.5でpHを増すに従つて徐々に正側え移動するが，それ以上の pH では半波電位の移動は殆んど認められない．第2段波の半波電位は pH3.5～12.5 でpHを増すに従つて何れも負側え移動する．波高は第1，第2段波とも pH3.5～7.0 では略等高であるが，それ以上のpHでは第1，第2段波とも波高は次第に低くなることが認められる．

定量条件　pH3.5～12.5の還元波の中でpH5.5～7.0の第1，第2段波はFig. 1に示す通り波形が良好であり濃度0.1～1.0*mM* で波高は濃度と比例する．pH3.5 の還元波は日時の経過と共に波形が変化するから定量に適せず，pH9.5～12.5の第1段波は作図上困難があり好ましくないが，それらの第2段波は定量可能である．

還元機構　o-クロルマーキュリフェノールの波高即ち限界電流は水銀柱の高さを変化させ，それと波高との関係を求め

Tab. 1. Polarographic Behavior of o-Chloromercuriphenol* in 80 Per Cent Ethanol

PH	$-E_{1/2}$ (vs. S. C. E,)V	Id**	Electron n
In 0.25 *M* NaBr, 0.04 *M* Britton-Robinson Buffer, 0.014% Gelatin-80% Ethanol.			
3.5	0.38	0.94	0.9
	0.68	1.02	1.0
5.5	0.37	0.95	1.0
	0.79	0.97	1.0
7.0	0.36	1.01	1.0
	0.89	1.06	1.1
9.5	0.34	0.86	0.9
	0.88	1.19	1.2
10.5	0.34	0.84	0.8
	0.92	1.11	1.1
12.5	0.34	0.70	0.7
	0.96	1.03	1.0

* 150°C, sp. gr. 2.102. Soln. viscosity, $\eta=19.85\times10^{-3}$ dyne sec cm^{-2}., Diffusion coefficient, $D=2.73\times10^{-6}$ cm^2 sec^{-1}. at 25°C.

** $id/Cm^{2/3}$ $t^{1/6}$. $m^{2/3}$ $t^{1/6}=2.218$.

たところ，拡散支配であることが認められたので，第7報に準じて還元機構に携わる電子数を求めた．

以上の結果を一括してTab. 1に示す．

Benesch等[2]は同報告中で，他の置換基をもたないフェニール水銀化合物の第1段波の半波電位は酸性側ではpHを増しても殆んど移動せず，アルカリ性側では負側え移動し．第2段波の半波電位は pH を増すにつれて負側え移動するとのべている．これは著者の酢酸フェニル水銀の場合[5]に略同様であつたが，オルト位置に水酸基があるo-クロルマーキュリフェノールでは第2段波の半波電位については上記の結果と略同様であるが第1段波の半波電位については上記結果の逆である．この現象はおそらくo-クロルマーキュリフェノールは特に酸性側において隣接する水酸基と塩化水銀基との間で六員環を作る傾向が大きい為であると考えられる．尚還元機構はBeneschの報告と大体同様と考えられる．これらを次に示す．

1st. Wave

In acid soln. :

(o-C₆H₄(O···H···Cl)Hg ring) $\xrightarrow{e}$ (o-C₆H₄(OH)Hg•) + Cl^-

In alkaline soln. :

(o-C₆H₄(O···H···OH)Hg ring) $\xrightarrow[H^+]{e}$ (o-C₆H₄(OH)Hg•) + H_2O

2nd. Wave

(o-C₆H₄(OH)Hg•) $\xrightarrow[H^+]{e}$ C_6H_5OH + Hg

総　括

o-クロルマーキュリフェノールはポーラログラフ的に還元波を呈し，pH3.5～12.5で常に2段波を与えたが，両波高ともpH9.5～12.5では次第に低くなつた．尚本化合物の第1波の半波電位はpH.3.5が最も負で，以下 pH9.5までは正側え移動し，それ以上の pH では移動は認められなかつた．第2波の半波電位はpHを増すにつれて負側え移動した．定量に際してはpH5.5～7.0の還元波が適し，濃度0.1～1.0*mM*で，定量出来る．なお本化合物の還元機構を推定したところBeneschの報告と大体一致した結果がえられた．

本研究に際して種々御高配を戴いた療品部長藤井正道博士，粘度測定に助力された菊池寛君に謹謝する．

文　献

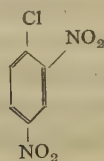
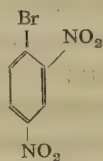
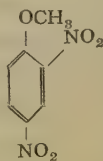
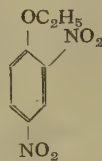
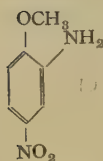
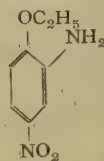
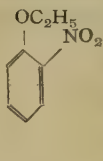
1) Page, J. E., Waller, J. G. : *Analyst*, 74, 292 (1949).
2) Benesch, R., Benesch, R. E. : *J. Am. Chem. Soc.*, 73, 3391 (1951).
3) Vojíř, V. : *Chem. Listy*, 46, 129 (1952); *C. A.*, 46, 10959c (1952).

4) Kajimura, T., Yamamoto, S.: *Japan Analyst*, 4, 152 (1955).
5) Satō, H.: *Japan Analyst*, 6, 166 (1957).
6) Whitmore, F. C., Woodward, G. E. in Gilman, H., "Organic Syntheses", Coll. Vol. I, 153 (1932), (John Wiley and Sons, Inc., New York).

（第9報）置換ニトロベンゾール類のポーラログラフィー

IX. Polarography of Substituted Nitrobenzenes

まえがき　本実験に用いた各種化合物の化学構造式とそれらの番号とをつぎに示す．以下化合物名を書く代りに番号を用いることとする．

Cl, NO_2, NO_2 （I）　Br, NO_2, NO_2 （II）　OCH_3, NO_2, NO_2 （III）　OC_2H_5, NO_2, NO_2 （IV）

OCH_3, NH_2, NO_2 （V）　OC_2H_5, NH_2, NO_2 （VI）　OC_2H_5, NO_2 （VII）　OC_2H_5, NO_2 （VIII）

（I）および（II）の母体であるところのChlorobenzene およびBromobenzeneのポーラログラフィーについてはStackelberg等[1]は0.05*M*の臭化テトラメチルアンモニウムを含む75%のジオキサン中で前者は還元波を示さず，後者は−2.32 V. の半波電位を示す還元波をえたと報告している．一方（I）および（II）よりクロルおよびブロムをとり去つた化合物，即ち m-Dinitrobenzene のポーラログラフィーについてPearson[2]は緩衝物質を含む8%エタノール中で pH0.5～3.8 では明瞭な2段波とそれに続く不明瞭な1段波，pH4.1～9.2 では明瞭な2段波を示すと報告している．他方（I）の関聯化合物としての o-Chloronitrobenzene および p-Chloronitrobenzene のポーラログラフィーについてDennis等[3]はMcIlvaine緩衝を含む50%エタノール中で何れも1段波を示す還元波をえ，それらの半波電位について強アルカリ性以外の場合では前者よりも後者の方が易還元性であると報告しているが，（I），（II）に関しては未だ報告は見当らない，又（III），（IV）の関聯化合物，即ちo-Nitroanisole, p-Nitroanisole 等についてはPage等[4]は10%アルコール中でオルト化合物の半波電位はパラ化合物のそれよりも約0.05V. 正側にあるとのべている．p-Nitrophenetole については80%アルコール中，0.25*M*塩化アンモニウムを用いてpH3.4～7.4 の半波電位と拡散電流恒数を佐藤[5]は報告した．又 o-Nitrophenol, p-Nitrophenol については特に酸性では o-Nitroanisole, p-Nitroanisole 以上にオルト化合物の半波電位の方がパラ化合物より約0.1V. 正側にあるとAstle等[6] Stocesova[7] 等は報告している．（III），（IV），（VII），（VIII）等についての報告は未だ見当らない様である．（V），（VI）は一名爆弾糖とも称せられ（V）は砂糖の約330倍，（VI）は約1400倍の甘味度があるといわれている化合物であるが，これらのポーラログラフィーに関する報告は松本等[8]は（V）について0.1*N*塩化カリウムを用い10%アルコールを含む緩衝液（pH 5）で定量出来ると報告している．著者は（I）～（VIII）の各化合物について第7報と同様な方法でポーラログラフィーを行つた結果について以下その概要をのべる．

実験の部

装置　第7報に準ずる．水銀滴下電極：(A) h=69.0cm, open circuit にて m=2.63×10⁻³g. sec⁻¹, $m^{2/3}t^{1/6}$=2.289. (B) h=64.0cm, open circuit にて m=2.51×10⁻³g. sec⁻¹, $m^{2/3}t^{1/6}$=2.218. 電解液の内部抵抗は500Ω以下であるから iR-drop は無視した．

材料　(Ⅰ) はmp. 51.2°C, (Ⅱ) はmp. 72.3°C, 両者ともChlorobenzeneあるいはBromobenzene から発煙硝酸と硫酸でニトロ化して合成した後，アルコールで数回再結晶した純品．(Ⅲ) はmp. 85～7°C, (Ⅳ) はmp. 84～5°C, 両者ともそれぞれのアルコール性アルカリで Alcoxy 化して合成した後，それぞれのアルコールから数回再結晶した純品．(Ⅴ) は mp. 117～8°C, (Ⅵ) はmp. 95～6°C, 何れもBlanksma等[9] の合成法，即ちそれぞれのアルコール中，硫化ナトリウムを用いてオルト位置のニトロ基のみ還元して合成した後，上記と同様再結晶した純品，(Ⅶ) はmp. 2°C, bp. 268°C, (Ⅷ) はm p. 58.5°C, 何れもそれぞれのニトロフェノールにジエチル硫酸を働かせて合成した後，分溜あるいは再結晶した純品．支持電解液は臭化ナトリウムの 2.5 *M* 水溶液，緩衝液は Britton-Robinson 緩衝，極大抑制剤は 1％ゼラチン水溶液．

操作　第7報に準ずる．

結果および考察

ポーラログラムに対するpHの影響　pH3.5～12.5における (Ⅰ)～(Ⅳ) のポーラログラムをFig. 1～4に示す．

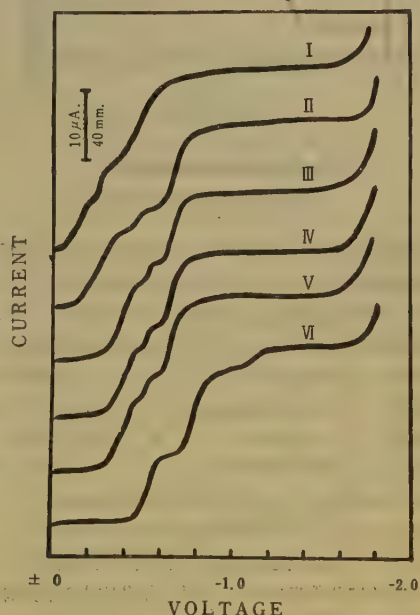
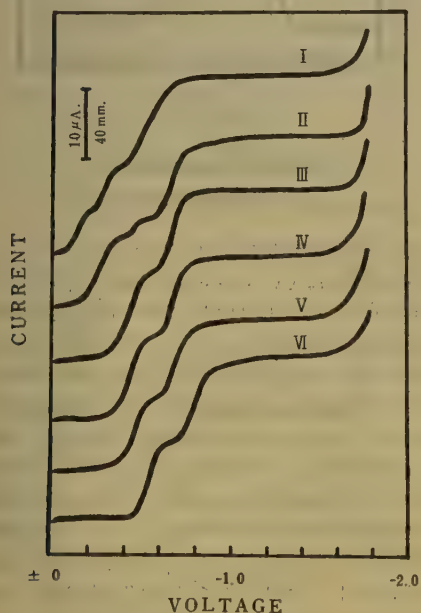



Fig. 1. Polarograms of 2,4-Dinitrochlorobenzene (Ⅰ)
Concentration 1.0 *mM*, Sensitivity 1/50,
pH : Ⅰ. 3.5, Ⅱ. 5.5, Ⅲ. 7.0, Ⅳ. 9.5,
Ⅴ. 10.5, Ⅵ. 12.5.
(Fig. 1～8 : all same conditions)

Fig. 2. Polarograms of 2,4-Dinitrobromobenzene (Ⅱ)

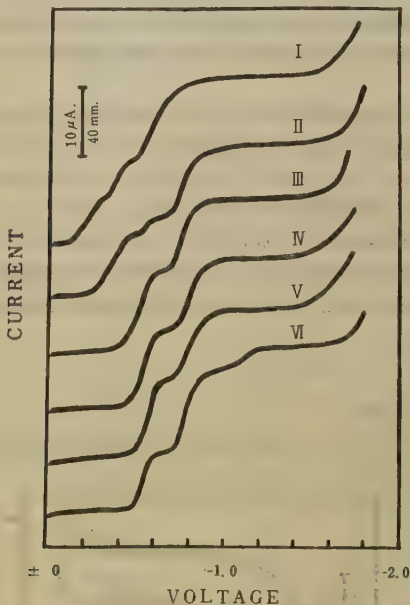



Fig. 3. Polarograms of 2,4-Dinitroanisole (III)

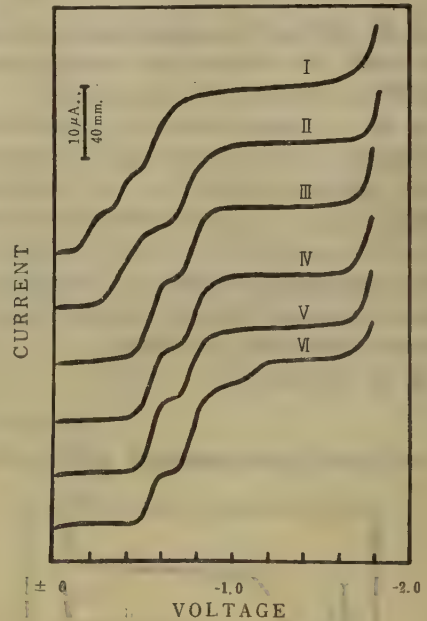



Fig. 4. Polarograms of 2,4-Dinitrophenetole (IV)

上記各化合物は何れもpH3.5では3段波を示す，pH5.5では（IV）のみは略等高の2段波，他の（I）～（III）の化合物は何れもpH3.5とは異なつた3段波を呈している．pH7.0～10.5では（II）のみ3段波，他の（I），（III），（IV）の化合物は何れも略等高の2段波を示している．pH12.5では（I）のみは2段波，他の（II）～（IV）は何れも3段波を示している．各々の全波高（各段階波を合計した波高）は4化合物とも pH3.5～12.5において略等高である．半波電位については（I），（II）はpH3.5,5.5,12.5では殆んど差異は認められないが，pH7.0～10.5では異つていることが認められる．一方（III），(IV)は pH3.5～12.5で波高および半波電位とも殆んど差異は認められない，しかしながら（I），（II）と（III），（IV）とを比較するときは波高においては略同高であるが，半波電位においては明らかに（I），（II）の方が（III）．（IV）よりも正側にあることが認められる．但しpH12.5の半波電位は4化合物とも略同様な半波電位をえている．これは強アルカリ性緩衝液を含む80％アルコール中では（I）～（IV）を含む電解液はみな一様に黄色を呈していることをも併せ考えると，おそらく（I）～（IV）の化合物はみなアルコール性アルカリの為に同じ化合物，即ち2,4-Dinitrophenol に変化している為と推察される．なお（I）のみは2段波を呈し，第1，第2段波の半波電位は他の（II）～（IV）と同様であるが，第3段波は殆んど不明瞭であるところをみるとアルコール性アルカリには最も変化しにくいことを示しているものと思われる．

つぎに pH3.5～12.5における（V），（VI）（VII），（VIII）等のポーラログラムをFig. 5～8に示す．
（V），（VI），は pH3.5～12.5においてともに略同様の半波電位がえられたが，波高は（V）の方が総体的に高いことが認められる．（VII），（VIII）は前記Page等の報告している o-Nitroanisole，p-Nitroanisole の様に約0.05V．も半波電位の差異は認められなかつたが，しかしながらアルカリ性側では（VII）は（VIII）よりも約0.03V．だけ半波電位は正側にあることが認められた．波高については（VIII）の方が総体的に高いことが認められた．

定量条件および還元機構 （I）～（III）の化合物の pH7.0～10.5の還元波は，波形，再現性ともに良好で何れも濃度0.1～1.0*mM* で定量出来る．（IV）の化合物は pH5.5～10.5において前記濃度で定量出来る．（V）～（VIII）の化合物はpH3.5～12.5の何れにおいても，波形，再現性ともに良好で何れも前記濃度で定量出来る．（V）～（VIII）

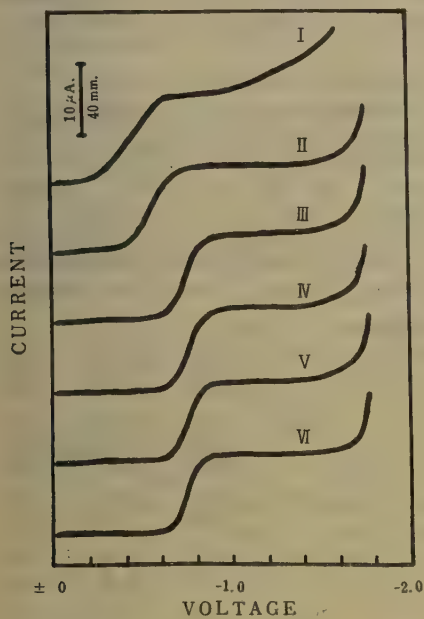



Fig. 5. Polarograms of
2-Amino-4-nitroanisole (V)

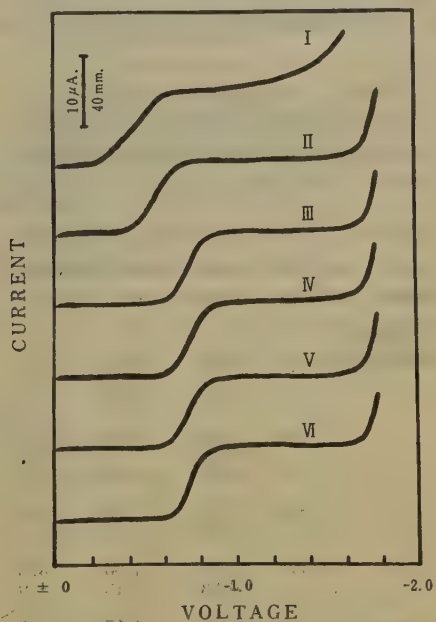



Fig. 6. Polarograms of
2-Amino-4-nitrophenetole (VI)

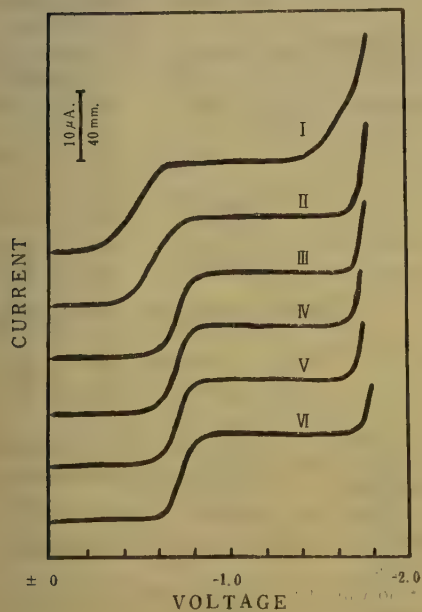



Fig. 7. Polarograms of
o-Nitrophenetole (VII)

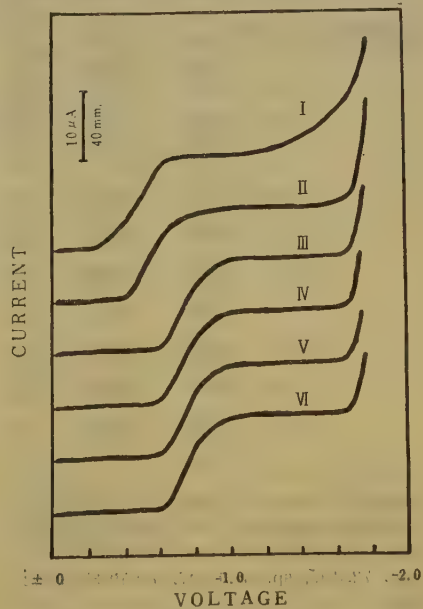



Fig. 8. Polarograms of
p-Nitrophenetole (VIII)

の各化合物の波高は水銀柱を変化させた結果，何れも拡散支配であることが認められるから，以下第7報に準じて各化合物の水銀滴下電極における還元機構に要する電子数nを求めた，以上の結果を一括して Tab. 1～4 に示す．

Tab. 1. Polarographic Behavior of 2,4-Dinitrochlorobenzene* and 2,4-Dinitrobromobenzene** in 80 Per Cent Ethanol

Compound	pH	-E1/2 (vs. S. C. E), V.	Id***	Electron n
In 0.25 *M* NaBr, 0.04*M* Britton-Robinson Buffer, 0.014% Gelatin -80% Ethanol.				
2,4-Dinitro-chlorobenzene (I)	3.5	0.32	2.77	2.7
		0.47	2.44	2.4
		0.73	5.59	5.4
	5.5	0.45	4.08	3.9
		0.65	1.35	1.3
		0.88	5.50	5.3
	7.0	0.62	5.08	4.9
		0.88	5.07	4.9
	9.5	0.63	4.96	4.8
		0.88	5.13	4.9
	10.5	0.64	4.17	4.1
		0.89	4.72	4.5
	12.5	0.74	4.52	4.4
		0.99	5.34	5.1
2,4-Dinitro-bromobenzene (II)	3.5	0.32	2.79	2.7
		0.46	2.45	2.4
		0.70	5.54	5.4
	5.5	0.44	4.64	4.5
		0.66	1.35	1.3
		0.87	5.17	5.0
	7.0	0.57	4.26	4.1
		0.71	1.30	1.3
		0.86	4.85	4.7
	9.5	0.57	3.90	3.8
		0.71	1.57	1.5
		0.86	4.84	4.7
	10.5	0.57	3.80	3.7
		0.71	1.59	1.5
		0.86	4.80	4.7
	12.5	0.73	3.92	3.8
		0.97	4.81	4.7
		1.33	1.22	1.2

* mp. 51.2°C, sp. gr. 1.630. Soln. viscosity, $\eta=19.94\times10^{-3}$ dyne sec cm^{-2}, Diffusion Coefficient, $D=2.97\times10^{-6}$ cm^2 sec^{-1}. at 25°C.

** mp. 72.3°C, sp. gr. 1.747. $\eta=19.85$, D=2.86.

*** $id/Cm^{2/3}$ $t^{1/6}$. Capillary(A), $m^{2/3}$ $t^{1/6}=2.289$.

Tab. 2. Polarographic Behavior of 2,4-Dinitroanisole* and 2,4-Dinitrophenetole** in 80 Per Cent Ethanol

Compound	pH	-E1/2 (vs. S. C. E), V.	Id***	Electron n
In 0.25 *M* NaBr, 0.04*M* Britton-Robinson Buffer, 0.014% Gelatin -80% Ethanol.				
2,4-Dinitro-anisole (III)	3.5	0.40	2.82	2.7
		0.57	2.28	2.2
		0.80	5.28	5.1
	5.5	0.54	4.22	4.1
		0.75	1.10	1.1
		0.97	4.82	4.6
	7.0	0.72	5.04	4.9
		0.98	4.98	4.8
	9.5	0.74	4.96	4.8
		1.01	5.04	4.9
	10.5	0.74	4.87	4.7
		1.00	4.84	4.7
	12.5	0.73	3.19	3.1
		0.97	5.43	5.2
		1.34	1.87	1.8
2,4-Dinitro-phenetole (IV)	3.5	0.40	2.45	2.4
		0.57	2.18	2.2
		0.80	5.32	5.3
	5.5	0.57	4.73	4.7
		0.97	5.32	5.3
	7.0	0.74	4.87	4.8
		0.98	4.85	4.8
	9.5	0.74	4.60	4.6
		0.99	4.82	4.8
	10.5	0.74	4.66	4.6
		0.98	4.61	4.6
	12.5	0.73	3.08	3.1
		0.98	5.41	5.4
		1.36	1.89	1.9

* mp. 85～7°C, sp. gr. 1.483. Soln. viscosity, $\eta=19.85\times10^{-3}$ dyne sec cm^{-2}, Diffusion Coefficient, $D=2.92\times10^{-6}$ cm^2 sec^{-1}. at 25°C.

** mp. 84～5°C, sp. gr. 1.393. $\eta=19.85$, D=2.79.

*** $id/Cm^{2/3}$ $t^{1/6}$. Capillary(B), $m^{2/3}$ $t^{1/6}=2.218$.

Tab. 3. Polarographic Behavior of 2-Amino-4-nitroanisole* and 2-Amino-4-nitrophenetole** in 80 Per Cent Ethanol

Compound	pH	-E1/2 (vs. S. C. E), V.	Id***	Electron n
In 0.25 *M* NaBr, 0.04*M* Britton-Robinson Buffer, 0.014% Gelatin- 80% Ethanol.				
2-Amino-4-nitroanisole (V)	3.5	0.66	4.96	4.6
	5.5	0.75	4.95	4.6
	7.0	0.95	4.88	4.6
	9.5	0.95	4.85	4.5
	10.5	0.94	4.66	4.4
	12.5	0.94	4.70	4.4
2-Amino-4-nitrophenetole (VI)	3.5	0.64	4.58	4.4
	5.5	0.75	4.49	4.3
	7.0	0.94	4.44	4.3
	9.5	0.94	4.59	4.4
	10.5	0.94	4.49	4.3
	12.5	0.95	4.59	4.4

* mp. 117～8°C, sp. gr. 1.563. Soln. viscosity, $\eta=19.67\times10^{-3}$ dyne sec cm^{-2}, Diffusion Coefficient, $D=3.15\times10^{-6}$ cm^{2} sec^{-1}. at 25°C.

** mp. 95～6°C, sp. gr. 1.417. $\eta=19.76$, D=2.97.

*** $id/Cm^{2/3}t^{1/6}$. Capillary (B), $m^{2/3}t^{1/6}=2.218$.

Tab. 4. Polarographic Behavior of o-Nitrophenetole* and p-Nitrophenetole** in 80 Per Cent Ethanol

Compound	pH	-E1/2 (vs. S. C. E), V.	Id***	Electron n
In 0.25 *M* NaBr, 0.04*M* Britton-Robinson Buffer, 0.014% Gelatin- 80% Ethanol.				
o-Nitrophenetole (VII)	3.5	0.69	5.57	5.5
	5.5	0.77	5.69	5.6
	7.0	0.92	5.64	5.5
	9.5	0.92	5.68	5.6
	10.5	0.93	5.70	5.6
	12.5	0.94	5.59	5.5
p-Nitrophenetole (VIII)	3.5	0.69	5.92	5.8
	5.5	0.77	5.83	5.7
	7.0	0.95	5.93	5.8
	9.5	0.95	6.03	5.9
	10.5	0.96	5.94	5.8
	12.5	0.97	5.86	5.7

* mp. 2°C, bp. 268°C, sp. gr. 1.190. Soln. viscosity, $\eta=20.12\times10^{-3}$ dyne sec cm^{-2}, Diffusion Coefficient, $D=2.83\times10^{-6}$ cm^{2} sec^{-1} at 25°C.

** mp. 58.5°C, sp. gr. 1.183. $\eta=19.85$, D=2.86.

*** $id/Cm^{2/3}t^{1/6}$. Capillary (B), $m^{2/3}t^{1/6}=2.218$.

Tab. 1～4より（I）～(VIII) の各化合物の還元機構は次式の如く推定される．

X, NO_2, NO_2 (benzene) $\xrightarrow[10H^+,\ -3H_2O]{10e}$ X, NH_2, NHOH (benzene) or X, NHOH, NH_2 (benzene)

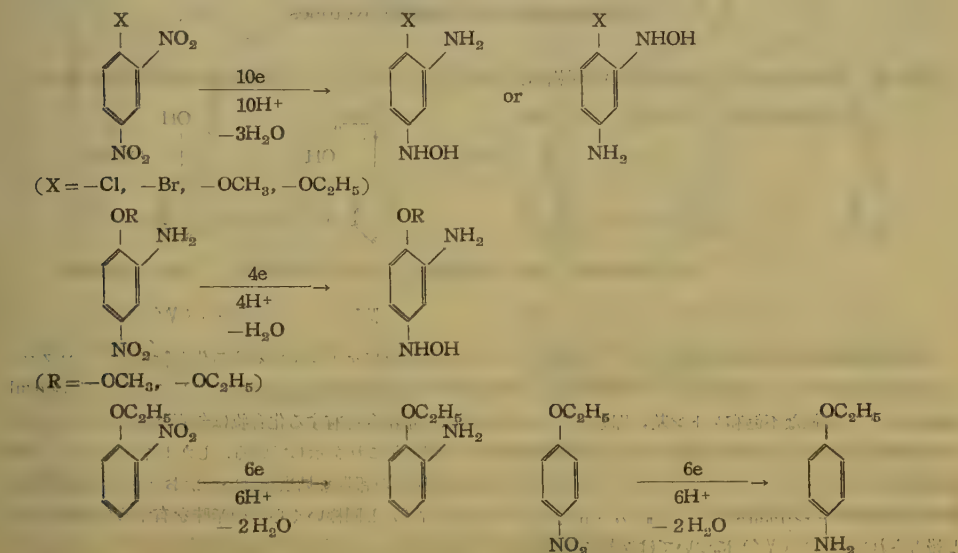
(X＝$-Cl$, $-Br$, $-OCH_3$, $-OC_2H_5$)

OR, NH_2, NO_2 (benzene) $\xrightarrow[4H^+,\ -H_2O]{4e}$ OR, NH_2, NHOH (benzene)

(R＝$-OCH_3$, $-OC_2H_5$)

OC_2H_5, NO_2 (benzene) $\xrightarrow[6H^+,\ -2H_2O]{6e}$ OC_2H_5, NH_2 (benzene)

OC_2H_5, NO_2 (para, benzene) $\xrightarrow[6H^+,\ -2H_2O]{6e}$ OC_2H_5, NH_2 (para, benzene)

総 括

置換ニトロベンゾール（Ⅰ）～（Ⅷ）の各化合物についてポーラログラフィーを実施した処下記の結果をえた．

(1) 各化合物は何れも明瞭な1～3段波を示し，pH7.0における各化合物の第1段波の半波電位よりみた易還元性の度合は（Ⅱ）>（Ⅰ）>（Ⅲ）>（Ⅳ）>（Ⅵ）≒（Ⅴ）>（Ⅶ）>（Ⅷ）の順である．又2,4-Dinitro化合物の1位置の置換基が半波電位を正側え移動させる効果は $-Br > -Cl > -OCH_3 > -OC_2H_5$ の順である．（Ⅴ），（Ⅵ）の化合物では1位置の置換基の影響は半波電位に殆んどあらわれていないが，（Ⅶ），（Ⅷ）の様なニトロ基の位置の異なる化合物ではアルカリ性側の半波電位は明らかに置換基の位置的影響をうけていることが認められた．

(2) 各化合物は定量条件の処でのべた通り0.1～1.0*mM*で定量出来る，なお各化合物の水銀滴下電極における還元機構について厳密なとり扱い方は困難であつたが，しかしながら各化合物の化学的還元における場合をも考慮した結果，前記の如き還元機構を推定した．

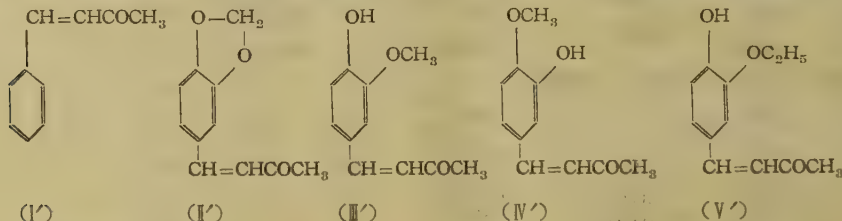
本研究に際し種々御高配を戴いた療品部長藤井正道博士，粘度測定に助力された菊池寛君に謹謝する．

文 献

1) Stackelberg, M. von., Stracke, W. : *Z. Electrochem.*, 53, 118 (1949).
2) Pearson, J. : *Trans. Faraday Soc.*, 44, 683 (1948).
3) Dennis, S. F., Powell, A. S., Astle, M. J. : *J. Am. Chem. Soc.*, 71, 1484 (1949).
4) Page, J. E., Smith, J. W., Waller, J. G. : *J. Phys. & Colloid Chem. Soc.*, 65, 35 (1943).
5) Satō, H. : THIS BULLETIN, 74, 39 (1956); *C. A.*, 51, 7898h (1957).
6) Astle, M. J., McConnell, W. V. : *J. Am. Chem. Soc.*, 65, 35 (1943).
7) Stocesova, D. : *Collection Czechoslov. Communs.*, 14, 615 (1949).
8) Matsumoto, K., Matsui, T. : *J. Pharm. Soc. Japan*, 73, 653 (1953).
9) Blanksma, J. J., van der Weyden, P. W. M. : *Rec. trav. chim.*, 59, 629 (1940) ; *C. A.*, 35, 4744[6] (1941).

（第10報）辛味性ケトン類のポーラログラフィー

X. Polarography of Pungent Ketones

まえがき 本実験に使用した各化合物の化学構造式と番号とをつぎに示す．以下化合物名には番号を用いる．

一般にAcetophenoneの様な飽和ケトンでしかもベンゾール核に直接ケトン基を有する化合物はポーラログラフ的に還元波を呈することは志方等[1]，Winkel等[2]，Adkins等[3]の諸報告がこれを明らかにしている．又Benzalacetone（Ⅰ′）の様な不飽和ケトン基，即ちケトン基の隣りに二重結合を有する化合物は矢張りポーラログラフ的に還元波を呈することはAdkins等[3]およびPasternak等[4]の報告がこれを示している．しかしながら（Ⅰ′）の置換化合物（Ⅱ′）～（Ⅴ′）のポーラログラフィーについては未だ何らの報告も見当らない．なお（Ⅲ′）は生薑の辛味成分Zingeroneの中間体であり（Ⅱ′），（Ⅳ′）についても（Ⅲ′）と同様いくらかの辛味を有する化合物であると報告されている[5]（Ⅴ′）については文献に記載がない化合物であり，著者はBourbonalacetoneと命名した．

黄色結晶で性質は（Ⅲ′）に類似している．著者は（Ⅰ′）～（Ⅴ′）の各化合物について第7報に準ずる方法でポーラログラフィーを行つた結果について以下その概略を報告する．

実 験 の 部

装 置 第7報に準ずる．水銀滴下電極：h＝64.0cm，open circuit にて$m=2.51\times10^{-3}$g. sec^{-1}，$m^{2/3}t^{1/6}=2.218$. 電解液の内部抵抗は何れの支持電解質を用いた場合でも500Ω以下であるからiR－dropは無視した．

材 料 （Ⅰ′）はmp. 42°Cの市販品，（Ⅱ′）はmp. 107～8°C，Kaufman等[6]の方法で合成した後，アルコールで数回再結晶した純品．（Ⅲ′）はmp. 128～9°C，野村[5]の方法で合成した後，前記と同様に処理した純品．（Ⅳ′）はmp. 80°C，野村[5]の方法に準じて合成した後，前記と同様に処理した純品．（Ⅴ′）はmp. 98～9°C，文献に記載がない化合物で，前記野村[5]の方法に準じて合成した後，前記と同様に処理した．なおポーラログラフでは純品であることが確かめられた．支持電解液は何れの場合も 2.5*M* 水溶液，緩衝液は Britton-Robinson 緩衝，極大抑制剤は1％ゼラチン水溶液．

操 作 第7報に準ずる．

結 果 お よ び 考 察

ポーラログラムに対するpHの影響 臭化テトラメチルアンモニウム，臭化ナトリウムおよび塩化アンモニウムを支持電解質として用い，pHを変化させた場合の（Ⅰ′）～（Ⅴ′）のポーラログラムをFig. 1～15に示す．

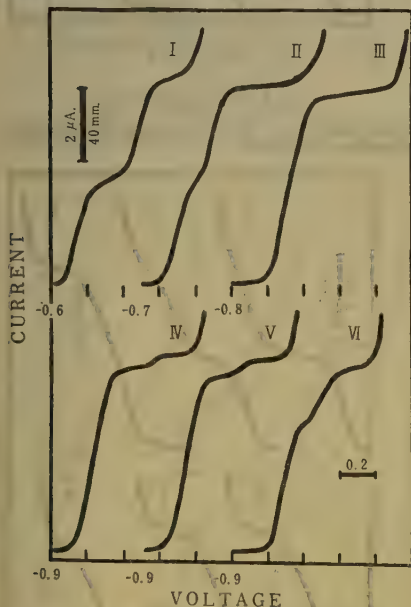



Fig. 1. Polarograms of Benzalacetone (Ⅰ′) by using Tetramethylammonium Bromide
Concentration 1.0 *mM*, Sensitivity 1/10,
pH： Ⅰ. 3.5, Ⅱ. 6.5, Ⅲ. 8.5, Ⅳ. 9.5, Ⅴ. 10.5, Ⅵ. 12.5.
(Fig 1～5 : all same conditions)

Fig. 2. Polarograms of Piperonalacetone(Ⅱ′)by using Tetramethylammonium Bromide

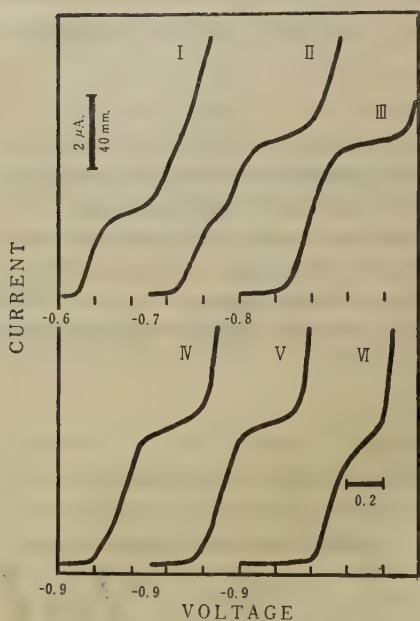



Fig. 3. Polarograms of Vanillalacetone(Ⅲ′)by using Tetramethyl-ammonium Bromide

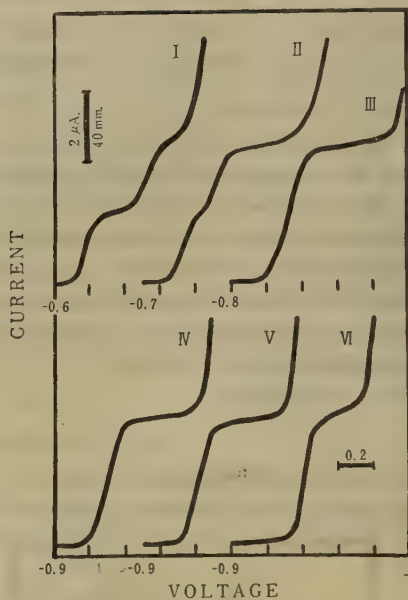



Fig. 4. Polarograms of Isovanillalacetone (Ⅳ′) by using Tetramethyl-ammonium Bromide

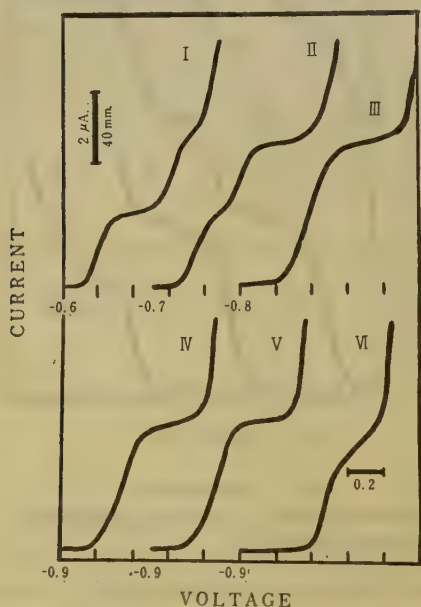



Fig. 5. Polarograms of Bourbonalacetone(Ⅴ′)by using Tetramethyl-ammonium Bromide

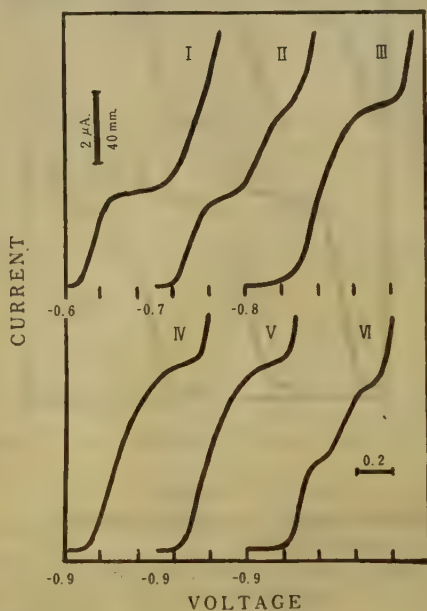



Fig. 6. Polarograms of Benzalacetone by using Sodium Bromide
C., 1.0 *mM*, S., 1/10,
pH : Ⅰ. 3.5, Ⅱ. 5.5, Ⅲ. 7.0, Ⅳ. 9.5, Ⅴ. 10.5, Ⅵ. 12.5.
(Fig. 6～10 : all same conditions)

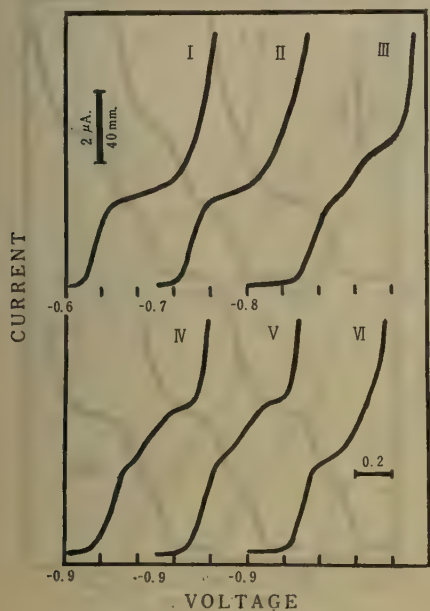



Fig. 7. Polarograms of
Piperonalacetone by using Sodium Bromide

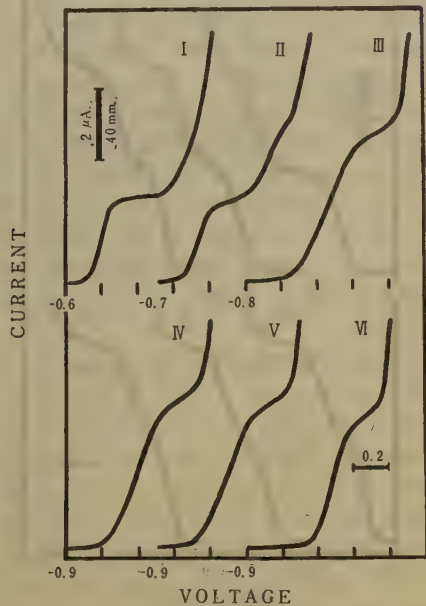



Fig. 8. Polarograms of
Vanillalacetone by using Sodium Bromide

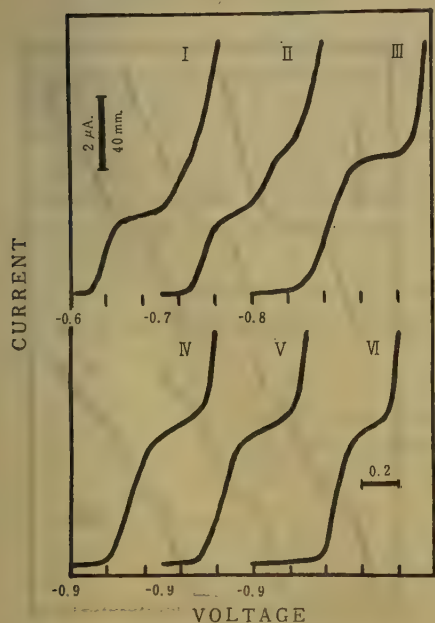



Fig. 9. Polarograms of
Isovanillalacetone by using Sodium Bromide

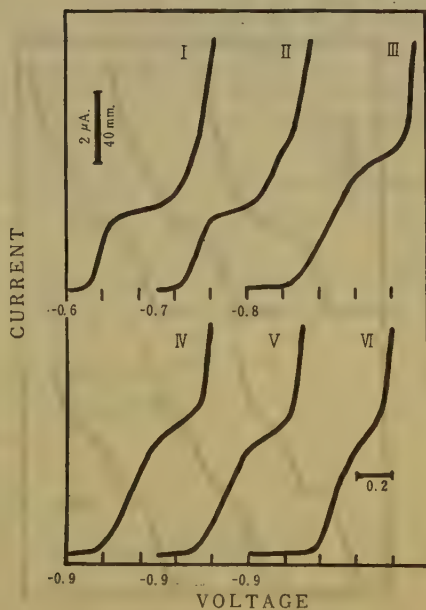



Fig. 10. Polarograms of
Bourbonalacetone by using Sodium Bromide

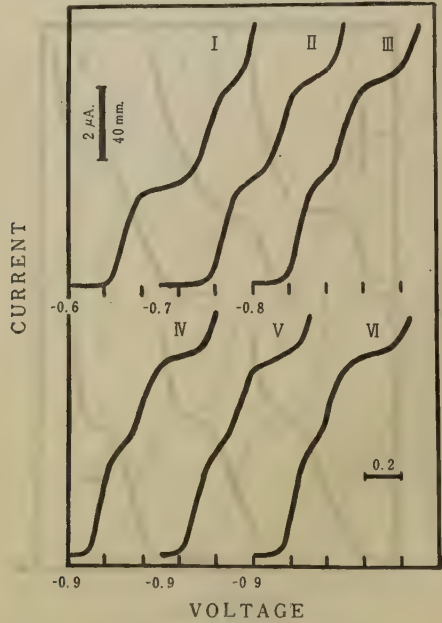



Fig. 11. Polarograms of
Benzalacetone by using Ammonium Chloride
C., 1.0 *mM*, S., 1/10,
pH : I. 3.5, II. 6.0, III. 6.9, IV. 7.3,
V. 7.8, VI. 8.5.
(Fig. 11~15 : all same conditions)

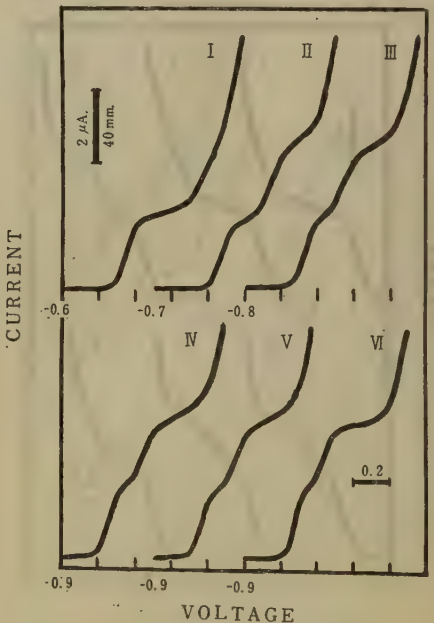



Fig. 12. Polarograms of
Piperonalacetone by using Ammonium Chloride

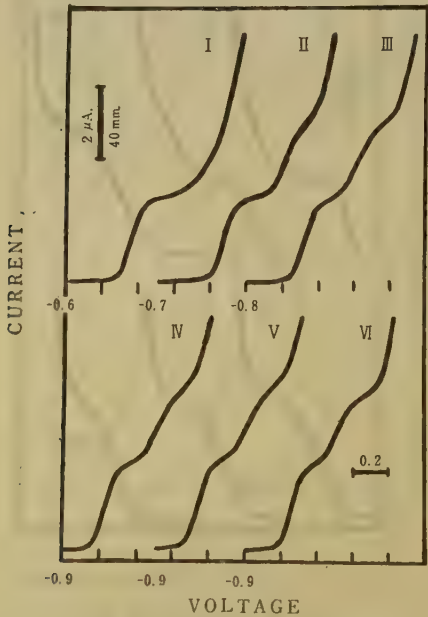



Fig. 13. Polarograms of
Vanillalacetone by using Ammonium Chloride

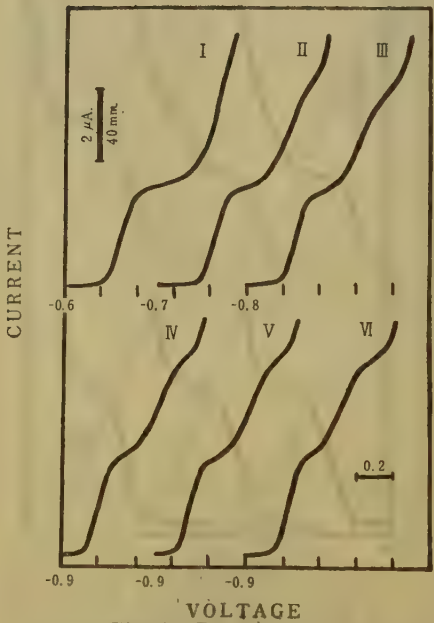



Fig. 14. Polarograms of
Isovanillalacetone by using Ammonium Chloride

Fig. 15. Polarograms of Bourbonalacetone by using Ammonium Chloride

（1） **臭化テトラメチルアンモニウムを支持電解質として用いた場合**　pH3.5では（Ⅲ′）のみは 1段波，（Ⅰ′），（Ⅱ′），（Ⅳ′），（Ⅴ′）は何れも2段波，（Ⅰ′）～（Ⅴ′）はpH6.5では何れも2段波，pH8.5では何れも1段波，pH9.5～12.5では（Ⅰ′）のみはすべて2段波，他の（Ⅲ′）～（Ⅴ′）ではすべて1段波，（Ⅱ′）はpH9.5, 10.5では1段波，pH12.5では2段波を示した．pH（Y軸）と半波電位（X軸）との関係を求めた曲線は何れも上下両端の円味のない左右逆S字状を呈し，（Ⅰ′），（Ⅱ′）では他の（Ⅲ′）～（Ⅴ′）に較べてその円味の度合はやや強い．

（2） **臭化ナトリウムを支持電解質として用いた場合**　pH3.5では（Ⅰ′）～（Ⅴ′）は何れも1段波，pH5.5では（Ⅱ′）のみは1段波，他の（Ⅰ′），（Ⅲ′）～（Ⅴ′）は何れも2段波，pH7.0では（Ⅱ′）のみは2段波，他の（Ⅰ′）（Ⅲ′）～（Ⅴ′）では1段波，pH9.5では（Ⅱ′）のみは2段波，他の（Ⅰ′），（Ⅲ′）～（Ⅴ′）は1段波，pH10.5では（Ⅱ′）のみは2段波，他の（Ⅰ′），（Ⅲ′）～（Ⅴ′）は1段波，pH12.5では（Ⅰ′）のみは2段波，他の（Ⅱ′）～（Ⅴ′）は何れも1段波を示した．pH（Y軸）と半波電位（X軸）との関係を求めた曲線は何れも上下両端が外側に曲つた左右逆L字状を呈し，（Ⅰ′），（Ⅱ′）では他の（Ⅲ′）～（Ⅴ′）に較べて上端の曲り具合は弱く略直線になつている．

（3） **塩化アンモニウムを支持電解質として用いた場合**　pH3.5では（Ⅰ′）のみは2段波，他の（Ⅱ′）～（Ⅴ′）は何れも1段波，pH6.0～8.5では（Ⅰ′）～（Ⅴ′）では何れも2段波を呈している．pH（Y軸）と半波電位（X軸）との関係を求めたところ，（Ⅰ′）～（Ⅴ′）の第1段波，第2段波においては何れも原点から右側え傾く直線を示し，第1段波の傾斜の度合は第2段波に較べてゆるやかである．

定量条件および還元機構　何れの支持電解質を用いた場合でも，一般にアルカリ性側の還元波は再現性がよくないから，定量に際しては酸性および中性側で行うべきである．この範囲で（Ⅰ′）～（Ⅴ′）は濃度0.1～1.0mMで何れも定量出来る．

（Ⅰ′）～（Ⅴ′）の波高は水銀柱を変化させた結果，何れも拡散支配であることが認められるから，以下第7報に準じて各化合物の水銀滴下電極における還元機構に要する電子数nを求めた，以上の結果を一括してTab. 1～3に示す．

Tab. 1. Polarographic Behavior of Pungent Ketones in 80 Per Cent Ethanol Containing Tetramethylammonium Bromide

Compound	pH	-E1/2 (vs. S. C. E), V.	Id*	Electron n
In 0.25 M $(CH_3)_4NBr$, 0.04 M Britton-Robinson Buffer, 0.014% Gelatin -80% Ethanol.				
Benzalacetone[a)]	3.5	0.98	1.33	1.3
（Ⅰ′）		1.34	1.29	1.3
	6.5	1.11	1.20	1.2
		1.34	1.27	1.2

Compound	pH	−E1/2 (vs. S.C.E), V.	Id*	Electron n
In 0.25 *M* $(CH_3)_4NBr$, 0.04*M* Britton−Robinson Buffer, 0.014% Gelatin −80% Ethanol.				
	8.5	1.33	2.30	2.2
	9.5	1.37 1.70	2.15 0.20	2.1 0.2
	10.5	1.38 1.70	2.09 0.22	2.0 0.2
	12.5	1.40 1.64	1.54 0.75	1.5 0.7
Piperonalacetone[b]	3.5	0.98 1.41	1.19 1.36	1.2 1.4
(Ⅱ′)	6.5	1.12 1.42	1.11 1.13	1.1 1.1
	8.5	1.39	2.18	2.2
	9.5	1.40	1.97	2.0
	10.5	1.42	1.92	1.9
	12.5	1.45 1.78	1.33 0.70	1.3 0.7
Vanillalacetone[c]	3.5	1.01	0.97	1.0
(Ⅲ′)	6.5	1.17 1.43	0.94 0.91	1.0 0.9
	8.5	1.42	1.83	1.9
	9.5	1.49	1.64	1.7
	10.5	1.54	1.67	1.7
	12.5	1.63	1.33	1.4
Isovanillalacetone[d]	3.5	1.01 1.36	0.89 0.96	0.9 1.0
(Ⅳ′)	6.5	1.15 1.36	0.87 0.83	0.9 0.9
	8.5	1.36	1.63	1.7
	9.5	1.43	1.52	1.6
	10.5	1.46	1.49	1.5
	12.5	1.56	1.44	1.5
Bourbonalacetone[e]	3.5	1.02 1.43	0.91 0.95	0.9 1.0
(Ⅴ′)	6.5	1.17 1.43	0.90 0.88	0.9 0.9
	8.5	1.40	1.64	1.7
	9.5	1.48	1.47	1.5
	10.5	1.51	1.44	1.5
	12.5	1.60	1.19	1.2

a) mp. 42°C, sp. gr. 1.035. Soln. viscosity, $\eta=19.67\times10^{-3}$ dyne sec cm^{-2}, Diffusion Coefficient, $D=2.88\times10^{-6}$ cm^2 sec^{-1}. at 25°C.

b) mp. 107~8°C, sp. gr. 1.084. $\eta=20.03$, $D=2.64$.

c) mp. 128~9°C, sp. gr. 1.074. $\eta=20.12$, $D=2.61$.

d) mp. 80°C, sp. gr. 1.068. $\eta=20.29$, $D=2.58$.

e) mp. 98~9°C, sp. gr. 1.103. $\eta=20.47$, $D=2.53$.

* $id/Cm^{2/3}\ t^{1/6}$. $m^{2/3}\ t^{1/6}=2.218$.

Tab. 2. Polarographic Behavior of Pungent Ketones in 80 Per Cent Ethanol Containing Sodium Bromide

Compound	pH	$-E_{1/2}$ (vs. S. C. E), V.	Id*	Electron n
In 0.25 *M* NaBr, 0.04*M* Britton-Robinson Buffer, 0.014% Gelatin -80% Ethanol.				
Benzalacetone[a] (I′)	3.5	0.94	1.17	1.1
	5.5	1.08 1.46	1.11 1.06	1.1 1.0
	7.0	1.37	2.16	2.1
	9.5	1.37	2.17	2.1
	10.5	1.38	2.09	2.0
	12.5	1.38 1.65	1.11 0.96	1.1 0.9
Piperonalacetone[b] (II′)	3.5	0.95	1.12	1.1
	5.5	1.08	1.11	1.1
	7.0	1.35 1.59	1.03 0.66	1.1 0.7
	9.5	1.34 1.60	1.02 0.81	1.0 0.8
	10.5	1.36 1.62	1.16 0.73	1.2 0.7
	12.5	1.40	1.05	1.1
Vanillalacetone[c] (III′)	3.5	0.99	1.04	1.5
	5.5	1.13 1.50	0.96 0.85	1.0 0.9
	7.0	1.45	1.74	1.8
	9.5	1.47	1.73	1.8
	10.5	1.47	1.71	1.7
	12.5	1.56	1.55	1.6
Isovanillalacetone[d] (IV′)	3.5	0.98	0.95	1.0
	5.5	1.12 1.46	0.96 0.82	1.0 0.8
	7.0	1.42	1.62	1.7
	9.5	1.43	1.61	1.6
	10.5	1.44	1.58	1.6
	12.5	1.55	1.54	1.6
Bourbonalacetone[e] (V′)	3.5	0.98	0.95	1.0
	5.5	1.10 1.49	0.94 0.70	1.0 0.7
	7.0	1.42	1.54	1.6
	9.5	1.45	1.53	1.6
	10.5	1.46	1.42	1.5
	12.5	1.52	1.24	1.3

a) $\eta=19.85$, D=2.86. b) $\eta=20.20$, D=2.63. c) $\eta=20.29$, D=2.59.
d) $\eta=20.03$, D=2.62. e) $\eta=19.94$, D=2.59.
* $id/Cm^{2/3}t^{1/6}$. $m^{2/3}t^{1/6}=2.218$.

Tab. 3. Polarographic Behavior of Pungent Ketones in 80 Per Cent Ethanol Containing Ammonium Chloride

Compound	pH	-E1/2 (vs. S. C. E), V.	Id*	Electron n
In 0.25 *M* NH_4Cl, 0.04*M* Britton-Robinson Buffer, 0.014% Gelatin -80% Ethanol.				
Benzalacetone[a] (I′)	3.5	0.95	1.21	1.2
		1.39	1.25	1.2
	6.0	1.09	1.26	1.2
		1.39	1.21	1.2
	6.9	1.13	1.23	1.2
		1.39	1.18	1.2
	7.3	1.13	1.27	1.2
		1.38	1.15	1.1
	7.8	1.14	1.25	1.2
		1.38	1.12	1.1
	8.5	1.19	1.26	1.2
		1.40	1.14	1.1
Piperonalacetone[b] (II′)	3.5	0.96	1.21	1.2
	6.0	1.08	1.17	1.2
		1.45	1.18	1.2
	6.9	1.12	1.12	1.1
		1.45	1.16	1.2
	7.3	1.15	1.15	1.2
		1.47	1.15	1.2
	7.8	1.16	1.14	1.2
		1.47	1.14	1.2
	8.5	1.18	1.10	1.1
		1.48	1.10	1.1
Vanillalacetone[c] (III′)	3.5	1.00	1.02	1.1
	6.0	1.13	1.01	1.0
		1.46	0.96	1.0
	6.9	1.18	1.02	1.1
		1.47	0.91	0.9
	7.3	1.18	1.00	1.0
		1.46	0.91	0.9
	7.8	1.20	1.00	1.0
		1.47	0.89	0.9
	8.5	1.22	0.97	1.0
		1.47	0.87	0.9
Isovanillalacetone[d] (IV′)	3.5	1.00	0.92	0.9
	6.0	1.13	0.84	0.9
		1.40	0.86	0.9
	6.9	1.18	0.81	0.8
		1.41	0.82	0.8
	7.3	1.19	0.88	0.9
		1.41	0.85	0.9
	7.8	1.19	0.87	0.9
		1.40	0.85	0.9
	8.5	1.21	0.87	0.9
		1.40	0.77	0.8
Bourbonalacetone[e] (V′)	3.5	1.00	0.99	1.0
	6.0	1.13	0.99	1.0
		1.48	0.87	0.9
	6.9	1.18	0.96	1.0
		1.51	0.85	0.9
	7.3	1.22	0.93	1.0
		1.51	0.84	0.9
	7.8	1.22	0.93	1.0
		1.52	0.81	0.8
	8.5	1.26	0.93	1.0
		1.53	0.80	0.8

a) $\eta=19.67$, D=2.88. b) $\eta=20.20$, D=2.63. c) $\eta=20.38$, D=2.57.
d) $\eta=20.03$, D=2.62. e) $\eta=19.94$, D=2.59.
* $id/Cm^{2/3}\ t^{1/6}$. $m^{2/3}\ t^{1/6}=2.218$.

Tab. 1～3より各支持電解質を用いた場合の(I′)～(V′)は水銀滴下電極においてPasternak[4]が(I′)について還元機構をのべたのと略同様と推定される．即ち酸性側では二重結合の還元に基く二量体生成えの第1段波および飽和ケトンえの第2段波，中性およびアルカリ性側では主として飽和ケトンえの1段波を示している．しかしながら支持電解質あるいは化合物の如何によつてはpH3.5附近で，その第2段波は支持電解質の最終上昇（水素イオン波）に重なるため1段波しか示さない場合がある．(cf. Fig. 3, 6～10, 12～15.) 又中性およびアルカリ性側で支持電解質あるいは化合物の如何によつては2段波を示す場合がある．(cf. Fig. 1, 2, 6, 7, 11～15.) なおアルカリ性側におけるカルボニル化合物の2段波についてAshworth[7]は主としてアルコールを生成する第1段波と一部分メタルケチル（Metal Ketyl）よりアルコールを生成する第2段波とで説明している．著者はこの説を不飽和ケトン中の二重結合の還元機構に適用した．以上の結果を綜合して（I′)～(V′）の還元機構を次の如く推定した．

In acid or neutral soln. :

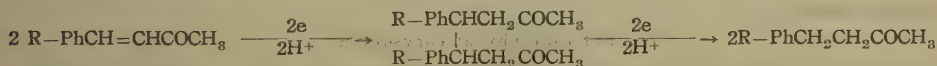
$$2\ \mathrm{R{-}PhCH{=}CHCOCH_3} \xrightarrow[2H^+]{2e} \begin{array}{c}\mathrm{R{-}PhCHCH_2COCH_3}\\ |\\ \mathrm{R{-}PhCHCH_2COCH_3}\end{array} \xrightarrow[2H^+]{2e} \mathrm{2R{-}PhCH_2CH_2COCH_3}$$

In alkaline soln. :

$$2\ \mathrm{R{-}PhCH{=}CHCOCH_3} \xrightarrow{2e} \mathrm{2R{-}Ph\dot{C}H\overset{\ominus}{C}HCOCH_3} \xrightarrow{2H^+} \mathrm{2R{-}Ph\dot{C}HCH_2COCH_3}$$

$$\xrightarrow[2H^+]{2e} \mathrm{2R{-}PhCH_2CH_2COCH_3}$$

(Partially)

$$2\ \mathrm{R{-}Ph\dot{C}H\overset{\ominus}{C}HCOCH_3} \xrightarrow{2M^+} \mathrm{2R{-}Ph\dot{C}HCHMCOCH_3} \xrightarrow[2H^+]{2e} \mathrm{2R{-}PhCH_2CHMCOCH_3}$$

総　　括

(1) 何れの支持電解質を含む80%アルコール中でも（I′)～(V′)は各pHにおいて，それぞれ明瞭な1～2段の還元波を呈し，その半波電位よりみた易還元性の度合は（I′)＞(II′)＞(IV′)＞(V′)＞(III′）の順である．又波高の大きさは（I′)＞(II′)＞(III′)＞(IV′)＞(V′)の順であり，拡散係数の大きさは（I′)＞(II′)＞(IV′)＞(III′)＞(V′）の順である．尚波高および拡散係数の大きさは分子量の大きさの順序に略一致することが認められた．

(2) 各化合物は定量条件の処でのべた如く 0.1～1.0*mM* で定量出来る．水銀滴下電極における還元機構について推定を行つた結果は Ashworth, Pasternak 等の報告に略一致することが認められた．尚（I′)～(IV′）の化学的還元生成物は何れも既知であつて，これとポーラログラフ的還元結果とは一致するから，水銀池を用いた定電位電解法で（I′）の2電子還元生成物，即ち Phenylethyl-methylketone，以下同様に（II′）に対しては 3,4-Methylendioxy-phenylethyl-methylketone,（III′）に対しては生薑の辛味成分の Zingerone,（IV′）に対しては Isozingerone,（V′）に対しては 4-Hydroxy-3-ethoxy-phenylethyl-methylketone がそれぞれ電解合成出来得ると推察された．

本研究に際し種々御高配を戴いた療品部長藤井正道博士，粘度測定に助力された菊池寛君に謹謝する．

文　　献

1) Shikata, M., Tachi, I. : *Mikrochemie*, 12, 62 (1933).
2) Winkel, A., Proske, G. : *Ber.*, 69, 1917 (1936).
3) Adkins, H., Cox, F. W. : *J. Am. Chem. Soc.*, 60, 1151 (1938).
4) Pasternak, R. : *Helv. Chim. Acta*, 31, 753 (1948).
5) Nomura, H. : *J. Chem. Soc.*, 111, 769 (1917); 東京化学会誌, 39, 722 (1918).
Dickinson, R., Heilbron, I. M., Irving, F. : *J. Chem. Soc.*, 1888 (1927).

6) Kaufmann, A., Radosević, R. : *Ber.*, 49, 675 (1916).

7) Ashworth, M. : *Collection Czechoslov. Chem. Communs.*, 13, 229 (1948).

Summary

Polarographic behaviors of chrysoidine, o-chloromercuriphenol, 2,4-dinitrochlorobenzene (Ⅰ), 2,4-dinitrobromobenzene(Ⅱ), 2,4-dinitroanisole(Ⅲ), 2,4-dinitrophenetole (Ⅳ), 2-amino-4-nitroanisole (Ⅴ), 2-amino-4-nitrophenetole (Ⅵ), o-nitrophenetole (Ⅶ), p-nitrophenetole (Ⅷ), benzalacetone (Ⅰ′) piperonalacetone (Ⅱ′), vanillalacetone (Ⅲ′), isovanillalacetone (Ⅳ′), and bourbonalacetone (Ⅴ′) have been investigated.

Each of these compounds, i. e., chrysoidine, o-chloromercuriphenol, (Ⅰ)～(Ⅷ), and (Ⅰ′)～(Ⅴ′) showed a clear reducing wave in electrolysis solution composed of 80 % alcohol containing 0.25 *M* NaBr, 0.04 *M* Britton-Robinson buffer, and 0.014 % gelatin.

The wave heights of these compounds, i. e., chrysoidine o-chloromercuriphenol, (Ⅰ)～(Ⅷ), and (Ⅰ′)～(Ⅴ′) were proportional to the concentration within the concentration range 0.1～1.0 *mM* in the following pH range.

Ⅶ. Polarography of chrysoidine

This substance showed a three in acid or neutral soln., or two in alkaline soln. —step wave. The wave height of the compound was proportional to the concentration within pH range of 3.5～5.5. The half-wave potentials of solns. with pH 3.5～12.5 were shifted towards the negative side with an increase in pH. The diffusion coefficient calculated from the Stokes-Einstein equation was applied to the Ilkovic equation to determine the electron number, from which was confirmed the reduction mechanism at the dropping mercury electrode;and the result agreed approximately with the report of Laitinen.

Ⅷ. Polarography of o-chloromercuriphenol

This organic mercury compound showed two-step wave in solns. with pH 3.5～12.5. With an increase in pH value, the half-wave potentials of first-step were shifted to the positive side at below pH 9.5 and to the same position at above pH 9.5, and the half-wave potentials of second-step were shifted to the negative side at pH 3.5～12.5. The diffusion coefficient calculated from the Stokes-Einstein equation was applied to the Ilkovic equation to determine the electron number, from which was confirmed the mechanism of reduction at the dropping mercury electrode; and the result agreed approximately with report of Benesch. (pH vs. quantitative determination : 5.5～7.0)

Ⅸ. Polarography of substituted nitrobenzenes

Each of these compounds showed a one vs. mononitro-compds., or two～three vs. dinitro-compds. —step wave in soln. with pH 3.5～12.5. The order of ease of reduction was (Ⅱ)>(Ⅰ)>(Ⅲ)>(Ⅳ)>(Ⅵ)≒(Ⅴ)>(Ⅶ)>(Ⅷ), Br>Cl >OCH_3>OC_2H_5 vs. (Ⅰ)～(Ⅳ), and ortho>para vs. (Ⅶ), (Ⅷ) for the first wave of these substances in solns. with pH 7.0.

Quantitative determination by polarography was possible as the wave height of these compounds were proportional to the concentration within pH 7.0～10.5 vs. (Ⅰ)～(Ⅲ), 5.5～10.5 vs. (Ⅳ), and 3.5～12.5 vs. (Ⅴ)～(Ⅷ).

The reduction mechanism at the dropping mercury electrode was deduced by applying the diffusion coefficient calculated from the Stokes-Einstein equation for determining the electron number in the Ilkovic equation.

Ⅹ. Polarography of pungent Ketones

Each of these compounds, i. e., (Ⅰ′)～(Ⅴ′) showed a clear reducing wave by using each of these 0.25 *M* supporting electrolytes, i. e., $(CH_3)_4NBr$, NaBr, and NH_4Cl., 0.04 *M* B. R. buffer in 80% alcoholic soln. containing 0.014 % gelatin.

The order of ease of reduction was (Ⅰ′)＞(Ⅱ′)＞(Ⅳ′)＞(Ⅴ′)＞(Ⅲ′) for the first wave of these compounds in solns. with various pH and supporting electrolytes.

The order of wave height and diffusion coefficient was (Ⅰ′)＞(Ⅱ′)＞(Ⅲ′)＞(Ⅳ′)＞(Ⅴ′), and (Ⅰ′)＞(Ⅱ′)＞(Ⅳ′)＞(Ⅲ′)＞(Ⅴ′) for the totaling each-step wave of these compounds in solns. with various pH and supporting eiectrolytes : both order was ascertained to be order of molecular weight of these compounds.

The wave height of these compounds was proportional to the concentration within pH range 3.5～8.5.

The diffusion coefficient calculated from the Stokes-Einstein equation was applied to the Ilkovic equation to determine the electron number, from which was confirmed the reduction mechanism at the dropping mercury electrode; and the result agreed approximately with report of Ashworth, and Pasternak.

Received June 18, 1957.

油性メチルパラフィノール・カプセルの定量法について

板 井 孝 信, 神 谷 庄 造

Determination of Methylparafynol in Vegetable-Oil Capsules.

By Takanobu Itai and Shôzo Kamiya

メチルパラフィノールは，次式のように三重結合を有する分子量98.14の不飽和アルコールで，1952年頃より米国で催眠薬として使用され始め，わが国でも製造されている．

$$CH_3-CH_2-\underset{OH}{\overset{CH_3}{\underset{|}{\overset{|}{C}}}}-C\equiv CH \qquad (3\text{-methyl-pentyne-ol-}3)$$

メチルパラフィノール・カプセル中のメチルパラフィノールの定量法には，ピリジン溶媒中，沃化メチル・マグネシウム溶液を作用させ，発生するメタンを定量する方法，また硝酸銀[1]または安息香酸銀[2]により銀アセチリドとし，過剰の銀イオンを逆滴する方法，また微量定量法として，生成したアセチリドを濾取し，これを比色定量する方法[3]がある．これらの方法を検討したが，何れも再現性にとぼしく，簡便でない．結局，L. Barns 等の方法[4]が，カプセル剤の定量に応用した場合，満足すべき結果を与えた．

この方法は，次式のように，硝酸銀を作用させ，生ずる硝酸をアルカリで滴定する方法である．この際，硝酸銀液は濃いものがよく，0.3Mを用い，指示薬としてメチル・パープルを用いる．指示薬には，またクロールフェノールレッド（変色点pH4.8～6.4）を代用してもよい．

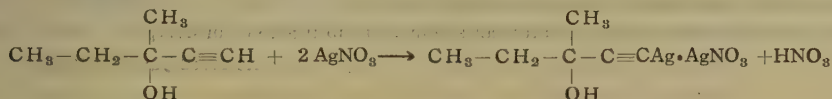
$$CH_3-CH_2-\underset{OH}{\overset{CH_3}{\underset{|}{\overset{|}{C}}}}-C\equiv CH + 2AgNO_3 \longrightarrow CH_3-CH_2-\underset{OH}{\overset{CH_3}{\underset{|}{\overset{|}{C}}}}-C\equiv CAg\cdot AgNO_3 + HNO_3$$

メチルパラフィノールの定量法を検討した際の試料は，精溜をくりかえし，bp.121～2°の部分を使用した．

Table 1. Results with pure methylparafynol.

Sample 1 (mg)	Content(%)	Sample 2 (mg)	Content(%)
204.4	99.15	202.4	98.86
199.3	99.31	199.3	98.70
199.8	99.30	199.0	98.38

Table 2. Results from Commercial Capsules.

Sample	Content (%)
1	97.82
2	104.15
3	99.84
4	101.52

試料を提供いただいた住友化学，大正製薬の各位に深謝する．

実 験 の 部

試 薬　0.3M 硝酸銀液：52.5g を水に溶かして 1,000ccとする．クロルフェノールレッド液：50mg を95%アルコール100ccに溶解させたもの．メチルパープル：U.S. Pat. No. 2416619,（Fleisher Chemical Co.）

定 量 法　本品5個を精密に秤り，カプセルを切り開き，内容を取り，エーテルで数回洗滌する．次で，デシケーター中に放置して，エーテルを完全に除いて後，再び秤量し，前後の差より，メチルパラフィノールの平均量を求める．メチルパラフィノール150～200mgに対応する量を 200cc の三角コルベン中に精密に秤り，アルコール15cc を加え溶解する．次で0.3M硝酸銀液 30ccを加え，よく混和し5分間放置後，N/10 水酸化ナトリウム液で滴定する．（指示薬　クロルフェノールレッド液またはメチルパープル液）別に同様の方法で空試験を行う．

N/10水酸化ナトリウム液 1cc＝9.814mg C_6H_{10}

総　　括

油性メチルパラフィノールカプセル剤中のメチルパラフィノールを定量するため，種々，検討したが，L. Barns の方法，すなわち 0.3Mの硝酸銀液を作用させ，生成する硝酸を，N/10 水酸化ナトリウム液で滴定する方法を応用した結果，油性カプセル剤中より±2%の精度で定量することが出来た.

文　　献

1) Sidney Siggia : " Quantitative Organic Analysis via Functional Groups" 2 nd. Ed. 1954 ; 桑田訳p. 82.
2) Israël Marszak and Michel Koulkis : *Mem. services chim. état* 36, 421 (1951).
3) Preston L. Perlman and Carol Tohnson : *J. Am. Pharm. Assoc.* 41, 14 (1952).
4) Lucien Barns and L. J. Molini : *Anal. Chem.* 27, 1025 (1955).

Summary

The ingredient in vegetable oil of Methylparafynol Capsules, can be determined in accuracy ±2% by L. Barns' procedure. Chlorophenol red may be used as the substitute of methyl purple.

Weigh accurately 5 Methylparafynol Capsules. Cut the capsules open and transfer the contents to a suitable vessel. Wash the capsules with small portions of ether, and allow the capsules to dry in a dessicator. Weigh the emptied capsules and calculate the weight of Methylparafynol as the difference of both weights.

Weigh accurately a portion of the oil, equivalent to about 150−200mg. of Methylparafynol, and dissolve it in 15cc. of alcohol. Add 30cc. of 0.3mol. silber nitrate, mix well, and allow to stand for 5 minutes. Titrate with tenth normal sodium hydroxide, using methylpurple solution as the indicator.

Perform a blank test using the same amounts of reagents.

Each cc. of tenth normal sodium hydroxide is equivalent to 9.814mg. of C_6H_{10}.

Received June 18, 1957.

赤外線吸収スペクトル分析の医薬品試験における応用（第4報）
消毒用アルコール中のアルコール類の定量

大 場 琢 磨

Application of Infrared Absorption Spectroscopy to Examination of Drugs and their Preparation IV.
Determination of Alcohols in "Alcohol for Disinfection".

Takuma ŌBA.

まえがき　国民医薬品集[1]による消毒用アルコールは 69.85～74.87 %の純エチルアルコールを含有している．しかし公定書外のものは，変性アルコールが使用され，又はイソプロピルアルコールが約10 %加えられている．最近市販の消毒用アルコールで標示成分と著るしく異つた組成の不良品が，厚生省並びに東京通商産業局によつて収去され，これらの中のアルコール類を定量する事が必要となつた．

現在メチルアルコールの含量は日本薬局方の一般試験法第19項[2]によつて規定されているが，その定量は，他のアルコールの含量に関係するので正確を期し難く，又他の化学的方法は，ただ一つのアルコールの含量を定量[3]することは行われているが，三つのアルコール類と水との混合物を簡単に定量することは殆んど困難である．

そこで筆者は消毒用アルコール中の水分を，あらかじめ除去し，これを赤外線吸収スペクトル分析法によつてアルコール類の含量比を決定し，別にカールフィッシャー法によつてえた水分の定量値より，各成分比を算出した．かくして極めて少量の試料からアルコール類の含有量を簡単迅速に定量することが出来た．すなわち水分を除去する方法は，試料にクロロホルムを混じ炭酸カリを添加して軽く振盪するのが好適であつた．メチルアルコール，エチルアルコール，イソプロピルアルコールの各クロロホルム溶液における赤外線吸収スペクトルを測定したところ，Fig. 1～3の如くであり，メチルアルコールの 9.84μ，エチルアルコールの 11.40μ，イソプロピルアルコールの10.58μの吸収帯を Key band に選んで，これら三成分系として通常法[4]により定量した．

実 験 の 部

（1） **実験装置**　東京大学工学部綜合試験所のBaird 製及び帝国石油K. Kの Perkin Elmerr21 型の記録式赤外線分光器を用いた．試料容器には岩塩の窓をもつ，液層の厚さ約 0.1mm のものを使用した．

（2） **標準物質**　標準物質としては，メチルアルコール（以下Mと略記）及びイソプロピルアルコール（以下Pと略記）は Eastman 社の分光光度測定用を，エチルアルコール（以下Eと略記）は純アルコールをナトリウムで脱水蒸溜したものを使用した．これらの赤外線吸収スペクトル（以下IRと略記）は Fig. 1～3 の如くである，溶媒には試薬特級のクロロホルムを用い，その濃度は 50mg/cc である．

（3） **試　料**　東京通商産業局において昭和32年2月に収去した2種，及び厚生省において昭和32年5月に収去した6種の消毒用アルコールを試料とした．その標示成分比は次の第1表の如くである．

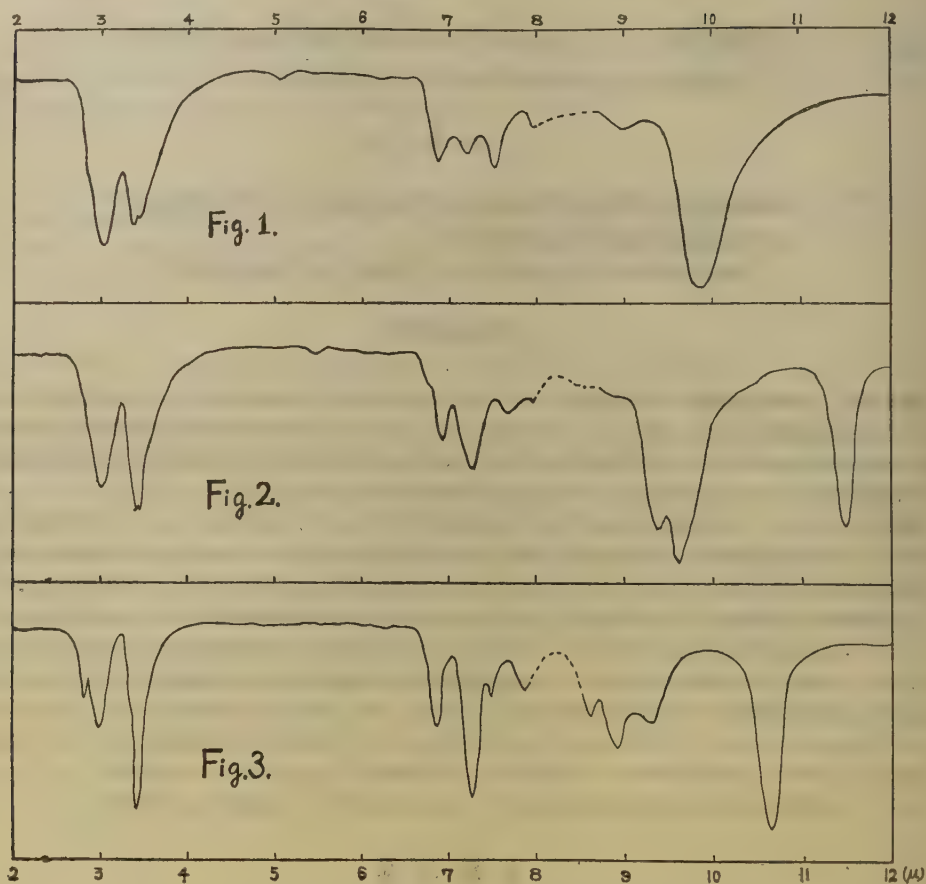



Fig. 1　Infrared spectrum of Methyl Alcohol in $CHCl_3$.
Fig. 2　Infrared spectrum of Ethyl Alcohol in $CHCl_3$.
Fig. 3　Infrared spectrum of iso-Propyl Alcohol in $CHCl_3$.

Table 1.　Contents of the Confiscated Preparations.

Sample No.	Sample Name	Indicated conponeut %			
		Methyl Alcohol	Ethyl Alcohol	iso-Propyl Alcohol	Water
1	消毒用Kアルコール	2.8	55.4	14.0	27.8
2	〃	〃	〃	〃	〃
3	消毒用Tアルコール	0.0	54.7	10.5	34.8
4	〃	〃	〃	〃	〃
5	K消毒用プロピルアルコール	〃	0.0	30.0	70.0
6	ネオNアルコール	〃	54.7	10.5	34.8
7	D消毒用アルコール	〃	52.0	9.0	39.0
8	Sネオ消毒用アルコール	〃	〃	〃	〃

（4） **アルコール類による岩塩の溶解**　M等のクロロホルム溶液を試料容器に入れたときに，その窓の岩塩が溶解される危険を考慮して，あらかじめ，溶解度試験を行つた．その結果M中に岩塩片を浸漬したときは1時間後に約1％，15時間後に約2％溶解したが，M 3％クロロホルム溶液中に浸漬したときには，15時間後にも減量は認められなかつた．（室温約15°）

E, Pについても大体同様の結果をえた．そこでこれらの条件では，アルコール類のクロロホルム溶液は試料容器の岩塩を溶解しないと考えられたので使用した．

（5） **実験操作**　一定量の試料を正確に分液ロート中に採り，これにクロロホルム約30ccを加えると白濁する．更に試料の水分約30～40％の場合には約4g．の乾燥炭酸カリ粉末を加えて軽く振盪するとクロロホルム液は脱水されて澄明となる．10分間放置後，クロロホルム液を分離，更に10ccのクロロホルムで炭酸カリを洗い，これらのクロロホルム液を合して，正確に100ccとする．このクロロホルム液中の水分はカールフィッシャー法で測定したところ，10～20 mgであつて使用に差支えないことを認めた．

（6） **検量線の作製**　検量線をかくために各標準物質について次の如き濃度のクロロホルム溶液を作つた．Mは40，30，20，10，5 mg/5cc，Eは150，120，90，60，30 mg/5cc，Pは100，80，60，40，20 mg/5ccとし，これらを試料容器に入れて吸収を測定し，波長9.84μ，11.40μ，10.58μにおける吸光度を各算出し，検量線を作製した．この結果，各検量線はFig. 4の如くで，Mは40mg/5cc，Eは150mg/5cc，Pは100mg/5cc迄はBeerの法則に従うことを認めた．但し，Pの①，③の傾きは非常に小さいので計算の場合無視した．

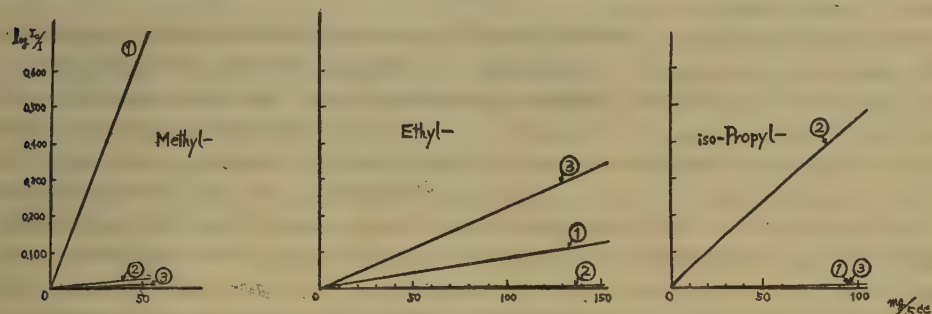



Fig. 4　Working curves of Methyl-, Ethyl-, and iso Propyl- Alcohol.
① 9.84μ　② 10.58μ　③ 11.40μ

（7） **標準混合試料の定量結果とそのYoudenの方法による検定**　次にこの検量線を用いて標準混合試料を定量したところ，第2表上段の如き結果をえた．この定量結果をYoudenの方法[5]で検定した．すなわち，今横軸

Table 2.　Determination of standard mixture and its test by Youden method.

Sample No.	Methyl Alcohol taken %	Methyl Alcohol found %	Ethyl Alcohol taken %	Ethyl Alcohol found %	iso-Propyl Alcohol taken %	iso-Propyl Alcohol found %
1	33.3	32.2	66.7	67.8	0.0	0.0
2	28.6	27.6	57.3	58.0	14.2	14.4
3	50.3	51.4	49.7	48.6	0.0	0.0
4	43.2	44.2	42.7	41.8	14.1	13.9
5	67.0	68.0	33.0	32.0	0.0	0.0
6	0.0	0.0	80.2	80.4	19.8	19.6
7	0.0	0.0	67.0	66.4	33.0	33.6
8	12.6	13.2	75.0	74.2	12.4	12.6
9	25.1	24.1	50.0	50.6	24.9	25.3

Test by Youden method.			
	$a=-0.39$	$a=-1.23$	$a=-0.06$
	$b=1.016$	$b=1.018$	$b=1.014$
	$S=0.837$	$S=0.720$	$S=0.228$
	$S_a=0.470$	$S_a=0.981$	$S_a=0.119$
	$S_b=0.013$	$S_b=0.0164$	$S_b=0.0069$
	$t_a=0.83$	$t_a=1.25$	$t_a=0.51$
	$t_b=1.23$	$t_b=1.10$	$t_b=1.99$

a : intercept.　　S_a, S_b : standard deviation for a and b.
b : slope.　　t_a, t_b : value of t-distribution for a and b.
S : standard deviation.　　* t_7 (0.05) =2.37

(x) に秤量混合したM,E,P の含有率（%）をとり，縦軸（y）に前記の定量結果をとり，それらの9点を最小二乗法で curve fitting すれば，分析方法に正確性がある場合には原点を通る 45° の直線即ちY=X なる直線となるべきである．そこで今Y=a+bX なる直線がえられたとして，a, b を最小二乗法で求め，それらが a=0, b=1 と見做しうるか否かを推定するのである．

第2表下段にその結果を示したが，M, E, Pのどの場合でも皆5%危険率でY=X 以外の直線であるとは見做し得ず，正確性のあることが認められる．又その標準偏差（S）はM 0.84%，E 0.72%，P0.23%であつた．

（8） **含水アルコールのクロロホロム・炭酸カリによる脱水抽出法の検討**　水20～30%を含むアルコールに炭酸カリを加えて塩析する方法では約5～10%の水がアルコール中に残り，同時に炭酸カリも混入される．又クロロホルムのみで抽出することも出来なかつた．そこで，これに代る方法として，(4)に述べたクロロホルム，炭酸カリの併用による抽出法を検討した．すなわち，M, E, Pの3者を一定量混合し，クロロホルムに溶解した場合（A）と，別にそれと同量のアルコールに水を添加してクロロホルム，炭酸カリで抽出した場合（B）とのIR の吸光度を比較した．すなわち，M, E, P, M+E（1：2）及び M+E+P（1：2：0.5，1：2：1, 0.5：3：0.5)の7種の（A）と，それらと水の比を変えた12種の（B）の吸光度を比較したが，それぞれ対応する（A）と（B）の吸光度の差はみられなかつた．従つて M, E, P は共にクロロホルムによる抽出差，炭酸カリの吸着差がないことが判明した．そこで以上の方法を用いて試料の定量が出来ることが判つた．

（9）．**試料の定量結果**　試料は先ず比重を測定し，カールフィッシャー法によつて水分を求めた．次に試料 3 ccを正確に採り前記(5)の実験操作に述べた如くにしてIR測定を行い，それらの結果より M, E, P 水の各百分率を算出した．第3表の如くである．

Table 3. Determination of the confiscated "Alcohol for disinfection."

Sample No.	Methyl Alcohol		Ethyl Alcohol		iso-Propyl Alcohol		Water	
	Indicated%	Found%	Indicated%	Found%	Indicated%	Found%	Indicated%	Found%
1	2.8	18.0	55.4	34.0	14.0	5.0	27.8	43.0
2	2.8	13.8	55.4	45.7	14.0	0.0	27.8	40.5
3	0.0	45.0	54.7	17.0	10.5	0.0	34.8	38.0
4	0.0	0.0	54.7	55.1	10.5	13.4	34.8	31.5
5	0.0	0.0	0.0	0.0	30.0	27.0	70.0	73.0
6	0.0	39.2	54.7	29.4	10.5	0.0	34.8	31.4
7	0.0	47.0	52.0	0.0	9.0	16.8	39.0	36.2
8	0.0	59.0	52.0	0.0	9.0	0.0	39.0	41.0

上表において，その標示量と測定値とに著しい差が認められ，殊にメタノールの量が非常に多く含有されていることが判明した．

本研究に御指導御配慮を頂いた板井部長，並びに赤外線分光器使用に御便宜，御指導を頂いた東京大学工学部応用化学科平野四蔵教授，田中誠之氏，帝国石油K.K. 手塚真知子嬢に厚く御礼申上げます.

総　　括

(1) M, E, P及び水の四成分よりなる消毒用アルコール中のM, E, Pの定量を行うために試料とクロロホルム，炭酸カリとを共振することによつて，成分アルコールの量に変化を与えることなしに，水分を除去しえた.

(2) M, E, Pの混合物は IR によつてM は9.84μ，Eは11.40μ，Pは10.58μ の Key band を用いておのおの標準偏差，0.84%，0.72%，0.23%で定量出来た.

(3) 収去された不良の消毒用アルコール8種をこの方法によつて定量した結果，全部が標示量と著しい差を示していた.

文　　献

1) 第二改正国民医薬品集，P, 23.
2) 第六改正日本薬局方，P. 456.
3) 高橋，早瀬：工化雑誌，55 205 (1952).
4) 例えば，板井，大場，田中：衛試，74 19 (1956).
5) Youden. W. J. : *Anal Chem.*, 19 946 (1947).

Summary

An infrared spectrophotometric procedure for the determination of methyl-, ethyl- and isopropyl alcohol in "alcohol for disinfection" is described.

The absorption bands at 9.84, 11.40 and 10.58μ characteristic of the methyl-, ethyl- and isopropyl-alcohol are used for the determination.

With about 0.1mm absorption cell, the standard deviations of the determination were 0.84% methyl-, 0.72% ethyl-, and 0.23% iso-propyl alcohol.

Water contained in the sample are remored by dissolving it in chloroform and shaking with dehydrated potassium carbonate. This solution is filted and diluted to a certain amount, and determined. This method give a good recovery.

This is useful in the examination of confiscated preparations of "alcohol for disinfection", shown in Table 4.

Received June 18, 1957.

医薬品の螢光分析に関する研究（第3報）医薬品の螢光強度及び螢光色

市 村 陽 二，太 幡 利 一

Studies on Fluorometric Analysis of Drugs. III. Fluorescence Intensity and Color of Drugs

Yōji Ichimura and Toshikazu Tabata

我々は医薬品の簡易確認，記録の目的で，第一報[1] で報告した装置を用いて，一般医薬品類の螢光の有無，及びその螢光強度を記録測定して肉眼による値との差を検討すると共にその螢光色を標準色[2] と比較した．

今回の試料中公定書収載医薬品は試験合格品を使用し，その他はこれに準ずる純品を使用し，その分類法は薬効別により，スルファミン剤等はその名称に入るものを総て集めて表示した．なお本研究の一部については既に報告[3] した．

実 験 の 部

本研究に使用した測定用光源，フイルター，フイルム，及びその装置は第二報[4] で報告した生薬類の螢光測定に用いたものと同じく，マツダSHL-100UV超高圧水銀燈，マツダUV-D_2（紫外線 3650 A透過用），AKAUV-O_2（紫外線 3650 A遮断用）フイルター，スーパーパンタイプフイルム（A.S.A.100），及びベツクマン分光光度計を使用した．

試料の処理法，及び表中の感度表示法は第一報[1] に述べた方法によつた．

なお表中 Riboflavine の螢光強度はその結晶形により相当な差異のあることが認められたので，これに関しての詳細はすでに発表済[5] である．

Samples	Fluorescence Intensity by Photograph	Fluorescence Intensity by Observed	Observed Color
Antibiotics.			
Chlortetracycline Hydrochloride	++	+++	reddish yellow
Tetracycline Hydrochloride	+	++	reddish yellow
Chloramphenicol	−	−	none
Oxytetracycline Hydrochloride	+	++	yellowish green
Streptomycin Sulfate	+	+	pale violet
Dihydrostreptomycin Sulfate	++	++	blueish white
Penicillin G	+	+	pale blue
Sulfa drugs.			
Sulfaisoxazole	++	+	pale blue
Sulfamerazine	+++	++	yellow
Sulfathiazole	++	+	pale blue
Sulfadiazine	++	++	blueish white
Phtalylsulfathiazole	+++	+++	intense white
Homosulfamine	++	++	buleish white
Sulfaguanidine	++	++	blueish white
Sulfanilamide	+	+	pale blue
Sulfaisomidin	+++	++	pale blue

Samples	Fluorescence Photograph	Intensity by Observed	Observed Color
	Antituberculous drugs.		
Isoniazid	+	+	parple
Sodium Paraaminosalicyl	+++	+++	intense blue white
Thioacetazon	++	+	yellow
Potassium Guaiacol sulfonate	++	+	whitish violet
	Digestants.		
Albumine Tannate	+	++	whitish brown
Diastase	+++	+++	intense yellowish white
Pancreatin	++	+++	intense reddish yellow
Saccharated Pepsin	+++	+++	blueish white
	Fungicide. Disinfectants.		
Acriflavine	++	+++	reddish yellow
Iodochlorohydroxyquinoline	—	—	none
Phenyl Salicylate	+++	+++	blueish white
Silver Protein	+++	+++	yellowish red
Sodium Denzoate	++	+	pale blue
Bismuth Subgallate	—	—	none
Merbromin	—	—	none
Benzalkonumchloride	++	++	blueish white
Methenamine	+	+	violet
Nitrofurazone	+	+	yellow
Sulfarsphenamine	+	+	yellow
Neoarsphenamine	+	+	yellow
Resorcinol	+	+	white
Betanaphthol	+	+	violet
Thianthol	++	+	pale blue
Cresol	—	—	none
Guanofuracin Hydrochloride	+	++	green
Iodoform	—	—	none
Salicyic Acid	+++	++	blueish white
	diotonics. Diuetics.		
Theophylline	+++	++	whitish blue violet
Urethan	+	+	white
Theobromine and Sodium Salicylate	+++	+++	blueish white
Theobromine and Calcium Saliccylate	++	++	whitish blue violet
Triaminotriazine	++	++	whitish violet
Aminophylline	+++	+++	intense blueish white
Theophylline and Sodium Acetate	+++	+++	intense blueish white
	Antiphyrtic. Analgesics. Sedatives. Hypnotics.		
Lactylphenetidin	++	++	yellow
Acetylsalicylic Acid	+	+	blue
Antipyrine	++	++	blueish white
Aminpyrine	+++	++	blueish white
Ethylaminobenzoate	+	+	blue

Samples	Fluorescence Photograph	Intensity by Observed	Observed Color
Pyrabital	+++	+++	yellow
Doxylamine	+++	+++	reddish white
Bromvalerylurea	+	+	white
Barbital	++	+	white
Phenobarbital	+	+	white
Chloral Hydrate	+	+	blue
Acetophenetidin	++	++	white
Acetanilid	+++	+++	blueish white
Sulpyrine	—	—	none
Methyl Salicylate	++	+	pale blue
Picric Acid	+	+	yellow
Sodium Salicylate	+++	+++	blueish white
Migrenin	++	++	blueish white
Cinchophen	+	++	whitish yellow
Sulfonal	++	+	white
Salicylamine	+++	+++	intense blueish white
Alkaloids.			
Caffeine	++	+	blueish violet
Caffeine and Sodium Benzoate	++	++	blue
Strychnine Nitrate	++	+	whitish violet
Pilocarpine Hydrochloride	++	+	whitish violet
Sparteine Sulfate	++	+	whitish violet
l-Ephedrine Hydrochloride	+	+	whitish violet
Scopolamine Hydrobromide	+	+	whitish violet
Cotarnine Chloride	+++	+++	whitish green
Atropine Sulfate	+	+	whitish violet
Quinine Ethylcarbonate	+++	++	violet
Quinine Sulfate	++	++	white
Quinine Bisulfate	+++	+++	intense blue
Quinine Hydrochloride	++	++	whitish violet
Papaverine Hydrochloride	+++	+++	whitish blue
Apomorphine	+++	+++	intense whitish blue
Vitamins.			
Paraaminobenzoic Acid	++	+	whitish violet
Thiamine Hydrochloride	+++	+++	whitish blue
Riboflavine	+	++	reddish yellow
Pyridoxin Hydrochloride	++	++	whitish violet
Ascorbic Acid	+	+	reddish yellow
Niacin	++	++	whitish blue
Niacin Amide	+++	+++	white
Vitamin A Palmitate	++	++	whitish yellow
Skipjack Liveroil (100,000)	++	++	whitish yellow
Sinthetic Vitamin A Acetate (500,000)	+++	++	yellowish green
Menadion Disulphite	+	+	white
Fravin Mono Nuleotide	+++	+++	reddish yellow

Samples	Fluorescence Intensity by Photograph	Fluorescence Intensity by Observed	Observed Color
Organic acid.			
Campholic Acid	+	+	whitish violet
Citril Acid	++	++	white
Tartaric Acid	+	+	white
Malic Acid	+	+	yellow
Lactic Acid (50%)	−	−	none
Cathartics.			
Phenovalin	+++	++	white
Phenolphthalein	+++	++	blueish white
Antioxydants.			
Pyrocatechine	+	+	white
Phenyl α-Naphtylamine	+++	+++	blueish white
Buthylated Protocatecuate	+++	+++	intense blueish white
Hydroquinone	++	+	white
Buthylated Hydroxyanisole	+++	++	plueish white
Dodecil Gallate	++	++	yellowish white
Octyl Gallate	++	++	blue
Thio Dipropionic Acid Raurate	+	+	whitish brown
Isoamyl Gallate	++	++	whitish blue
Nor Dihydro Guajareticacid	+	+	whitish brown
Chemicals.			
Thiourea	++	+	white
Diphenylamine	+++	++	whitish violet
P-Aminoacetopheon	+++	++	yellowish green
Dihydroacetic Acid	+	++	whitish yellow
Other drugs.			
γ-BHC	+	+	white
DDT	+	+	white
Cerium Oxalate	±	+	green
Lactose	+	+	pale blue
Tannic Acid	+	++	whitish yellow
Dulcin	+	+	white
Soluble Saccharin	+	+	white
Linseed Oil	++	++	blueish white
Santonin	+	+	green
Sodium Santonin	−	−	none
Mentol	+	+	yellow
Sodium Citrate	+	+	white
Bismufh Subsalicylate	−	−	none
Phenyl Mercuric Acetate	++	++	white reddish yellow
Anhydrous Dextrose	+	+	white
Hexylresorcinol	+	+	white
Diphenhydramine Hydrochloride	+	++	whitish yellow
Chiniofon	±	+	red

本研究に際し終始御指導，御鞭撻を賜わつた刈米達夫所長，山本展由部長，下村孟技官，並びに有益な御助言及び多数の試料を分与して戴いた武田薬工中山課長，高村課長に深謝する．

文　　献

1) 太幡，市村，薬誌，76，1031—1034（1956）．
2) 色彩科学協会編；標準色名（1951）．
3) 市村，太幡，第九回，日本薬学大会講演．
4) （市村，太幡）薬誌，76，1087—1089（1956）．
5) 太幡，市村，第九回，日本薬学大会講演．

Summary

About 140 kinds of official and nonofficial drugs were classified by medicative principles and measured their fluorescence intensity and colors.

Recieved June 18, 1957.

医薬品の螢光分析に関する研究（第4報）色素類の螢光強度及び螢光色

太幡利一，市村陽二

Studies on Fluorometric Analysis of Drugs. IV. Fluorescence Intensity and Color of Coal-Tar Colors

Toshikazu TABATA and Yōji ICHIMURA

我々は第一報[1]で医薬品類の固体状態に於ける螢光を写真フイルムに感光させる装置，及びその螢光強度測定方法について報告し，第二報[2]で生薬類約100種，第三報[3]で公定書，及び公定書外医薬品137種の螢光色，及び螢光強度について報告したが，本報は食品，香粧品，医薬品用，及び其の他の Coal-Tar Colors についての実験結果を報告する[4]．Coal-Tar Colors に含有される螢光成分は沪紙クロマトグラフィーにより分離した場合は必ずしも単一でなく，又そのものの主成分によるものでない事が多いが，これ等がそのままの粉末の状態では自己消光の影響によつて螢光の出る可能性は非常に少く，我々の集めた試料中には Violet, Blue, Green 系の螢光色が殆んど認められなかつた．螢光発現の理論より考えて，これ等の系統の螢光色を示すものは白色光下では無色，又は微黄色粉末であるためである．

又螢光染料は我々の研究目的外であるので本報では省略した．

実験の部

Samples			Fluorescence Photograph	Intensity by Observed	Observed Color
D.C.	Black	No. 1	−	+	dark red
D.C.	Brown	No. 1	−	+	dark red
F.D.C.	Blue	No. 1	−	−	none
D.C.	Blue	No. 6	−	−	none
D.C.	Violet	No. 1	−	−	none
D.C.	Violet	No. 2	−	−	none
F.D.C.	Green	No. 1	+	+	brown
F.D.C.	Green	No. 2	−	−	none
F.D.C.	Green	No. 3	−	−	none
D.C.	Green	No. 5	−	−	none
D.C.	Green	No. 6	−	−	none
D.C.	Green	No. 7	−	−	none
F.D.C.	Yellow	No. 1	−	−	none
F.D.C.	Yellow	No. 3	±	+	dark red
F.D.C.	Yellow	No. 4	±	+	drak red
F.D.C.	Yellow	No. 5	−	+	drak red
F.D.C.	Yellow	No. 6	+	++	red
D.C.	Yellow	No. 7	−	−	none
D.C.	Yellow	No. 8	±	+	red
D.C.	Yellow	No. 10	+	++	reddish yellow
D.C.	Yellow	No. 11	++	+++	reddish yellow
Ext. D.C.	yellow	No. 1	−	+	dark red

Samples	Fluorescence Photograph	Intensity by Observed	Observed Color
D.C. Orange No. 3	+	+++	bright red
D.C. Orange No. 4	+	+++	bright red
D.C. Orange No. 16	+	++	dark red
F.D.C. Red No. 1	±	+	dark red
F.D.C. Red No. 2	±	+	dark red
F.D.C. Red No. 3	−	+	dark red
F.D.C. Red No. 4	−	++	red
D.C. Red No. 11	−	+	dark red
D.C. Red No. 13	−	+	dark red
D.C. Red No. 18	−	+	dark red
D.C. Red No. 19	−	++	red
D.C. Red No. 28	−	+	dark red
D.C. Red No. 33	−	+	dark red
Ext. D.C. Red No. 1	−	+	dark red
Ext. D.C. Red No. 5	±	+	dark red
Ext, D.C. Red No. 8	−	+	red
Ext. D.C. Red No. 10	−	+	dark red
Chinalizarin	−	−	none
Janusgreen	−	−	none
Malachitgreen	−	−	none
Brillantgreen	−	−	none
Chrysoidin	−	−	none
Auramin O	+	++	reddish yellow
Congored	±	+	dark red

本研究に際し，終始御指導，御鞭撻を賜わつた刈米達夫所長，山本展由部長に深謝する．

文 献

1) 太幡，市村，薬誌，76，1031−1034 (1956).
2) 市村，太幡，薬誌，76，1087−1089 (1956).
3) 市村，太幡，第九回，日本薬学大会講演.
4) 市村，太幡，第九回，日本薬学大会講演.

Summary

The 46 kinds of dyes (According to the designations F., D. and C.; D. and C.; Ext. D. and C.; or others) were measured their fluorescence intensity and Colors.

Received June 18, 1957.

インシュリンの薬化学的研究（第19報）*
純系マウスを用いるインシュリンの検定

長 沢 佳 熊，中 山 豪 一
西 崎 笹 夫，芹 沢 　 淳

Pharmaceutical and Chemical Studies of Insulin. XIX.
On the Assay of Insulin by the Uniform Strain Mice.

Kakuma NAGASAWA, Goichi NAKAYAMA,
Sasao NISHIZAKI and Jun SERIZAWA

まえがき　著者等は第13報[1]においてインシュリンのマウス・ケイレン法について報告した．ただしそのときは雑系のマウスを用いたが，今回は特に純系マウスを用い雑系と比較しその利点を調べようと試みた．ここに用いたマウスは実験動物中央研究所から配布された純系マウス（ddN系およびSm系）であつた．雑系マウスについては第13報の成績を引用し（実験1参照），今回の純系マウスによる実験結果（実験2～8参照）と比較した．ただしこの際，純系マウスは固型飼料Cleaを与えたものであり，雑系マウスは小麦，煮干，野菜を与え試験2日前からミルクを与えた．

以上雑系，純系の実験を比較した結果，実験温度35°と37°，および雑系，純系では明らかにケイレンを起す最少量が異る．またddN系，Sm系のケイレン状態にも若干の差を認めた．

実 験 の 部

1）**注射液の調製**　日局インシュリン標準品の適当量を精秤し，日局記載のインシュリン溶剤を用いて20 u/ccの濃度に溶かしインシュリン注射原液とした．

2）**試 験 動 物**

雑系（市販マウス）：♂　生年月日不明，体重 15～20 g.

ddN 系：♂ 200 匹　昭和 31.6.5～9 に出生したもの．

Sm 系：♂ 200 匹　昭和 31.9.25～29 に出生したもの．

これらのマウス 30～50 匹ずつを飼育箱に入れ飼育した．

3）**実験方法**　第13報に準じ試験前日午後4時から飼育室の温度を35°に調節し，飼育箱から水以外の食餌をとり去る．

翌朝温度（35°）を確かめた．37°の実験では午前9時 37°に調節した．

マウスの体重を秤量し，各群のマウスの体重の平均値およびバラツキが均等となるように各群にふり分ける．

午前 11 時から各群別にインシュリン原液を溶剤適当量で稀釈した注射液 0.25 cc ずつをマウスの頸背部に皮下注射し，5～10 匹ずつを径 18 cm，高さ 23 cmのガラス円筒に入れ竹製スノコをかぶせて反応症状を観察した．症状として定型的なケイレンを起すか，または低血糖性昏睡症状をあらわし，背位にさせたとき自力で腹位にもどらないものを反応陽性とした．

反応陽性マウスはただちに15%ブドウ糖注射液 0.5 cc ずつを腹腔内に注射し，実験終了後反応陰性マウスにもブドウ糖を注射して飼育を続けた．これらのマウスは実験終了後少くとも1週間を経過して次回の実験に供した．

注射直後から30 分，60 分，90 分（1部は120 分）の間隔内に起つた反応陽性マウスの匹数から統計的方法により直線性を検討し[2)3)] ED50値およびその信頼限界（%）を算出した．

また実験3において恒温箱を用いたが，これは注射直後マウスを各個室の金網カゴに入れ，二重ガラス蓋で外気と遮断し換気装置により一定温度の空気を還流させて内部の温度を一定に保ち反応症状を観察した．

---

* 第18報は本誌 74，179～183（昭和31年）

実験結果

実験 1

使用したマウス：雑系（市販マウス） 実験場所：恒温室 実験温度：35°±0.5°

前報に1部誤りがあつたので訂正し，90分観察の結果から用量−反応間の直線性の検討およびED50値とその信頼限界を算出しTable 1に示す．

Table 1. Calculation of regression equation, ED50 and its fiducial limits of error.
These data are quoted from table 13 in Bull. Hyg. Lab. 72, 17 (1954) and partly corrected.

Dose (u/cc)×cc	log(Dose ×100) (x)	No. of Mouse (n)	r	p(%)	Empirical Probit	Exppeted Probit (Y)	nw	y	nwx	nwy
0.0574×0.35	0.30	25	5	20	4.16	4.4	13.950	4.18	4.1850	58.3110
0.0630×〃	0.34	〃	11	44	4.85	4.6	15.025	4.86	5.1085	73.0215
0.0861×〃	0.48	〃	13	52	5.05	5.2	15.675	5.05	7.5240	79.1588
0.0945×〃	0.52	〃	17	68	5.47	5.3	15.400	5.46	8.0080	84.0840
0.1292×〃	0.66	〃	19	76	5.71	5.9	11.775	5.69	7.7715	66.9998
0.1418×〃	0.70	〃	22	88	6.18	6.0	10.957	6.16	7.6825	67.6060
Total							82.800		40.2795	429.1811

$1/Snw = 1/82.800 = 0.01208$　$\bar{x} = 40.2795/82.800 = 0.4865$; $\bar{y} = 429.1811/82.800 = 5.1833$

$Snwx^2$	$Snwxy$	$Snwy^2$
21.2750	215.5846	2255.1569
(−) 19.5947	(−)208.7826	(−)2224.5954
Sxx=1.6803	Sxy=6.8020	Syy=30.5615
		(−)27.6155
		$2.9460 < \chi^2_{[4]}$

$b = Sxy/Sxx = 4.0481$; $V(b) = 1/Sxx = 0.5951$

The Regression equation is

$$Y = \bar{y} + b\,(x - \bar{x}) = 4.05x + 3.21$$

$$\log ED50 = \bar{x} + \frac{5 - \bar{y}}{b} = 0.4412$$

$\therefore ED50 = 0.0276$ unit/mouse

$$g = t^2V(b)/b^2 = \frac{1.96^2 \times 0.5951}{4.0418^2} \fallingdotseq 0.140$$

log fiducial limit $(g > 0.1) =$

$$x + \frac{g}{1-g}\,(x - \bar{x}) \pm \frac{t}{b(1-g)}\sqrt{\frac{1-g}{Snw} + \frac{(x-\bar{x})^2}{Sxx}} = 0.4339 \pm 0.0606 = 0.3733 \sim 0.4945$$

∴ Fiducial limits of error(%)=86～113%　(P=0.95)

実験 2

使用したマウス：ddN 系　実験月日：昭和 31. 7. 6.　実験場所：恒温室　実験温度：35°±0.5°
湿度：64%　生後日数：約 30日　体重：13～15 g

実験経過を Table 2 に示す．

Table 2. Result of response observed in experiment 2.

Dose (u/cc)×cc	n	30 min.	60 min.		90 min.		120 min.	
0.0574×0.25	30	0	0		0		0	
0.0630× 〃	〃	0	0		0		0	
0.0800× 〃	〃	0	2	(7)*	2	(7)	2	(7)
0.0945× 〃	〃	0	2	(7)	2	(7)	2	(7)
0.1292× 〃	〃	0	0		0		0	
0.1418× 〃	〃	0	1	(3)	2	(7)	2	(7)
0.1418×0.50**	3	0	1	(33)	2	(67)	3	(100)

* ( ) : means % value.

** Another three mice were applied, as the response was very weak.

実 験 3

使用したマウス：ddN 系　実験月日：昭和 31. 7.20.　実験場所：恒温箱　実験温度：35°±2°
生後日数：約 44日　体重：12～21 g
実験経過を Table 3 に示す.

Table 3. Result of response observed in experiment 3. (Dose ratio : 1.25)

Dose (u/cc)×cc	n	30 min.		60 min.		90 min.		120 min.	
0.512×0.25	10	0		2	(20)	6	(60)	8	(80)
0.640× 〃	10	0		3	(30)	9	(90)	9	(90)
0.800× 〃	9	1	(11)	4	(44)	8	(89)	9	(100)
1.000× 〃	10	0		5	(50)	7	(70)	8	(80)
1.250× 〃	9	0		8	(89)	9	(100)	9	(100)

実 験 4

使用したマウス：ddN 系　実験月日：昭和 31. 7.24.　実験場所：恒温室　実験温度：35°±0.5°
湿度：54%　生後日数：約 48日　体重：14～24 g
実験経過を Table 4 に示す.

Table 4. Result of response observed in experiment 4. (Dose ratio : 1.5)

Dose (u/cc)×cc	n	30 min.	60 min.		90 min.		120 min.	
0.1500×0.25	25	0	0		1	(4)	1	(4)
0.2250× 〃	〃	0	5	(20)	8	(32)	8	(32)
0.3375× 〃	〃	0	4	(16)	12	(48)	17	(68)
0.5063× 〃	〃	0	6	(24)	18	(72)	21	(84)

以上のうち 90 分観察の反応から用量反応間の直線性の検討および ED50 値とその信頼限界を求めた．その結果をTable 5 に示す．

Table 5. Calculation of regression equation, ED50 and its fiducial limits of error.

Dose (u/cc)×cc	log(Dose ×100) (x)	No. of Mouse (n)	r	p(%)	Empirical Probit	Expected Probit (Y)	nw	y	nwx	nwy
0.1500×0.25	0.57	25	1	4	3.25	3.4	5.950	3.27	3.3915	19.4565
0.2250× 〃	0.75	〃	8	32	4.53	4.2	12.575	4.57	9.4313	57.4678
0.3375× 〃	0.93	〃	12	48	4.95	4.9	15.850	4.95	14.7405	78.4575
0.5063× 〃	1.10	〃	18	72	5.58	5.7	13.300	5.58	14.6300	74.2140
Total							47.675		42.1933	229.5958

$1/Snw=1/47.675=0.02975$ $\bar{x}=42.1933/47.675=0.8850$; $\bar{y}=229.5958/47.675=4.8159$

$Snwx^2$	$Snwxy$	$Snwy^2$
38.8083	208.7919	1128.2271
(−)37.3419	(−)203.1967	(−)1105.6997
Sxx=1.4464	Sxy=5.5952	Syy=22.5274
		(−)21.3491
		1.1783 $<\chi^2_{[2]}$

$b=Sxy/Sxx=3.8156$; $V(b)=1/Sxx=0.6819$

The Regression equation is

$$Y=\bar{y}+b\ (x-\bar{x})\ =3.82x+1.44$$

$$\log ED50=\bar{x}+\frac{5-\bar{y}}{b}=0.9332$$

∴ ED50=0.0857u/mouse

$$g=t^2V(b)/b^2=\frac{1.96^2\times0.6819}{3.8156^2}=0.180$$

log fiducial limit $(g>0.1)$ =

$$x+\frac{g}{1-g}(x-\bar{x})\pm\frac{t}{b(1-g)}\sqrt{\frac{1-g}{Snw}+\frac{(x-\bar{x})^2}{Sxx}}=0.9438\pm0.0858=0.8580\sim1.0296$$

∴ Fiducial limits of error(%)=84～125 % (P=0.95)

また同様操作により120分観察の反応から回帰直線方程式，ED50値およびその信頼限界を求め，結果のみを示す．

回帰方程式 : Y=5.03 x+0.65
ED50値 : 0.0730 u/mouse
その信頼限界(%) : 87～116%

実験 5

使用したマウス：ddN系 実験月日：昭和 31.11. 7. 実験場所：恒温室 実験温度：37°±0.5°
湿度：32% 生後日数：約 153日 体重：21～32 g

実験経過を Table 6 に示す．

Table 6. Result of response observed in experiment 5. (Dose ratio : 1.5)

Dose (u/cc)×cc	n	30 min.	60 min.	90 min.
0.067 ×0.25	22	1 (5)	7 (32)	7 (32)
0.100 × 〃	〃	4 (18)	10 (45)	11 (50)
0.150 × 〃	〃	6 (27)	16 (73)	17 (77)
0.225 × 〃	〃	9 (41)	21 (95)	21 (95)

実験5ではすべてのマウスは90分後には回復したので以後の観察を中止した.

90分観察の反応から実験4と同様の操作により直線性の検討およびED 50値とその信頼限界を求めた. 次にその結果のみを記す.

回帰直線方程式　：　Y=3.75x+3.61

ED50値　：　0.0233 u/mouse

その信頼限界(%)　：　77～120%

実験2～5の90分および120分観察の結果をFig. 1に示す.

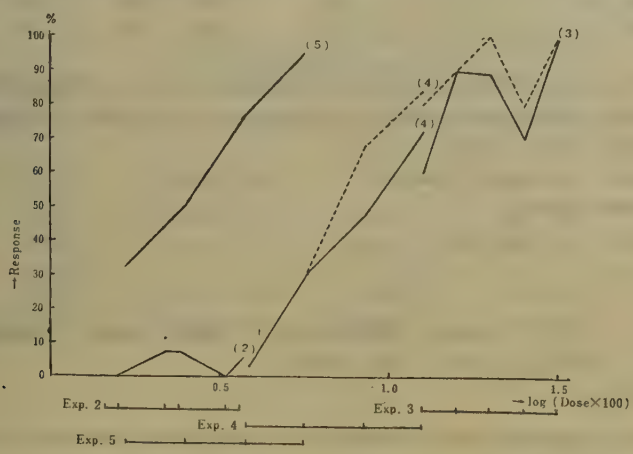



Fig. 1. Dose-response relationship of ddN strain, from table 2, 3, 4 and 6.

Exp. 2, 3 and 4. : at 35°.

Exp. 5. : at 37°.

———— : Observed for 90 min.

-------- : Observed for 120 min.

実　験　6

使用したマウス：Sm 系　実験月日：昭和 31.10.25.　実験場所：恒温室　実験温度：35°±0.5°

湿度：35%　生後日数：約 28日　体重：11～16 g

実験経過をTable 7に示す.

Table 7. Result of response observed in experiment 6. (Dose ratio : 1.5)

Dose (u/cc)×cc	n	30 min.	60 min.		90 min.		120 min.	
0.133× 0.25	10	0	0		0		0	
0.200× 〃	〃	0	0		0		0	
0.300× 〃	〃	0	3	(30)	4	(40)	5	(50)
0.450× 〃	〃	0	2	(20)	5	(50)	6	(60)
0.675× 〃	〃	0	0		7	(70)	10	(100)

実　験　7

使用したマウス：Sm 系　実験月日：昭和 31.11. 6.　実験場所：恒温室　実験温度：35°±0.5°

湿度：38%　生後日数：約 40日　体重：12～20 g

実験経過をTable 8に示す.

Table 8. Result of response observed in experiment 7. (Dose ratio : 1.5)

Dose (u/cc)×cc	n	30 min.		60 min.		90 min.	
0.0600×0.25	22	0		0		0	
0.0900× 〃	〃	0		0		0	
0.1350× 〃	〃	0		2	(9)	2	(9)
0.2025× 〃	〃	0		6	(27)	7	(32)
0.3038× 〃	〃	1	(5)	9	(41)	12	(55)
0.4556× 〃	〃	2	(9)	12	(55)	18	(82)

実験7ではすべてのマウスは90分後には回復したので以後の観察を中止した．90分観察の反応から0.1350～0.4556u/ccの4用量につき実験3と同様の操作により直線性の検討およびED 50値とその信頼限界を求めた．次にその結果のみを記す．

回帰直線方程式　：　Y=4.13x+1.54

ED50値：0.0689 u/mouse

その信頼限界（%）　：　84～121%

実　験　8

使用したマウス：Sm 系　　実験月日：昭和31.11.14.　　実験場所：恒温室　　実験温度：37°±0.5°

湿度：30%　　生後日数：約48日　　体重：13～23 g

実験経過を Table 9 に示す．

Table 9. Result of response observed in experiment 8. (Dose ratio : 1.5)

Dose (u/cc)×cc	n	30min.		60min.		90min.	
0.050×0.25	25	0		2	(8)	2	(8)
0.075× 〃	〃	0		3	(12)	3	(12)
0.113× 〃	〃	2	(8)	10	(40)	11	(44)
0.169× 〃	〃	2	(8)	14	(56)	15	(60)
0.253× 〃	〃	5	(20)	18	(72)	21	(84)

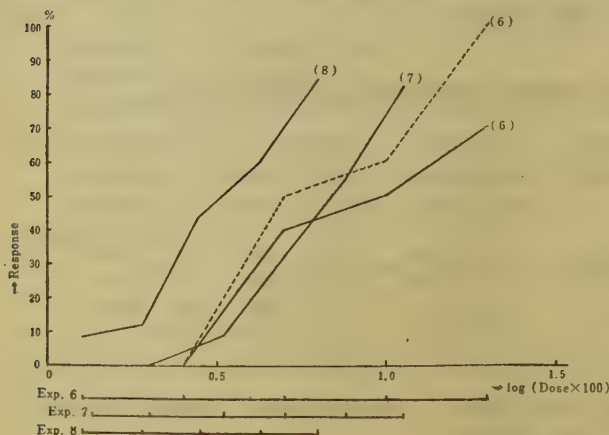



Fig. 2. Dose-response relationship of Sm strain, from table 7～9.
Exp. 6 and 7. : at 35°.
Exp. 8. : at 37°.
------ : Observed for 90 min.
...... : Observed for 120 min.

実験 8 ではすべてのマウスは90 分後には回復したので以後の観察を中止した．

90分観察の反応から 0.075～0.253 u/ccの 4 用量につき実験 4 と同様の操作により直線性の検討および ED 50値とその信頼限界を求めた．次にその結果のみを示す．

回帰直線方程式 ： Y =3.83x+2.94 ED50値 ： 0.03 45u/mouse その信頼限界（%）： 83～119%

実験 6～8 の90 分，120分観察の結果を Fig. 2 に示す．

雑系および純系マウスの回帰直線および ED50 値を比較し，実験 1，4，5，7，8 の結果を Table 10 に示す．またプロビット坐標により Fig. 3 に図示する．

Table 10. Comparison of regression equations, ED50 and their fiducial limits of error.

Strain	Temp.	b	Regression equation	ED50 (u)	Fiducial limits of error (P=0.95)(%)	Relative value of ED50
Ordinary	35°	4.05	Y=4.05x+3.21	0.0276	86～113	1
ddN	35°	3.82	Y=3.82x+1.44	0.0857	84～125	3.10
	37°	3.75	Y=3.75x+3.61	0.0233	77～120	0.84
Sm	35°	4.13	Y=4.13x+1.54	0.0689	84～121	2.50
	37°	3.83	Y=3.83x+2.94	0.0345	83～119	1.25

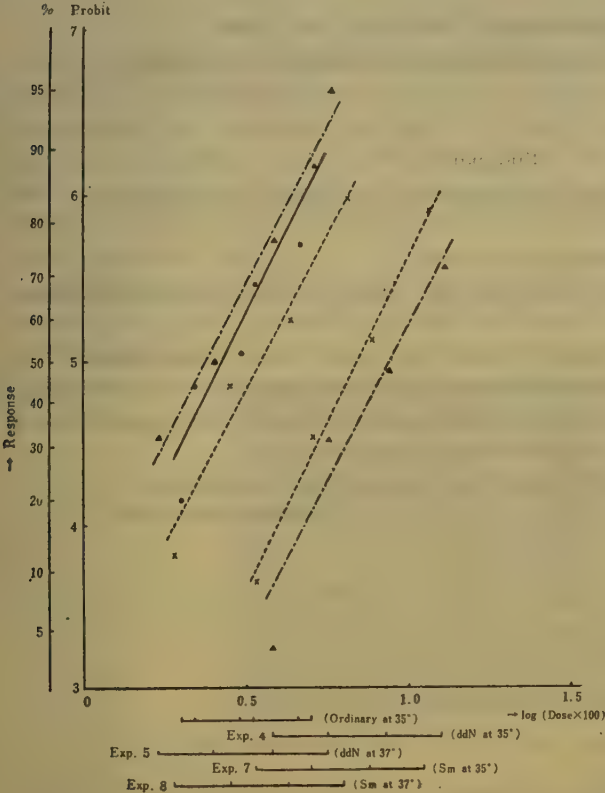



Fig. 3. Comparison of regression lines, from table 10. (Observed for 90 min.)

——●—— : Ordinary mice

---▲--- : ddN Strain.

···×··· : Sm Strain.

考察とむすび

(1) 症状：雑系マウスでは注射後 30分〜60 分でケイレンを起す数が最も多く，そのケイレン症状は大部分定型的なものである．しかるに ddN 系では生後 30〜40日のものは注射後 60分〜90分に反応陽性のものが多くしかも定型的なケイレン症状はきわめて少く大部分昏睡に陥るものであつた．しかし老齢期になるにしたがい定型的ケイレン症状を示すものが多く，反応の出方も雑系のものに近くなる傾向を認めた．Sm 系の場合，反応を示すまでの時間および症状は雑系の場合に近い．

(2) 健康状態：純系の場合各回の実験終了後死亡するマウスは雑系に比しきわめて少い．これは栄養状態がよいためかも知れない．

(3) ED50：純系マウスは雑系に比し鋭敏度(b)は大きな差異が認められない (Table 10)．しかし同じ 35°の実験では感度は 2.5〜3 倍鈍いが 37°の実験は雑系の 35°の実験に近い．また ddN系とSm 系では実験回数が少いため差があるとは結論できない．

(4) ED50の信頼限界：ED50値の信頼限界は雑系，純系ともにほとんど差異は認められない．

したがつて (1)〜(4) からマウスケイレン法によりインシュリンを検定する場合必ずしも純系マウスを用いる必要はない．

終りに本研究費の1部を各種系統マウスの生理的特徴に関する文部省科学研究費に依つた．その研究班長安東洪次博士に謝意を表する．

文　献

1) 長沢他，本誌 72 11−19 (昭29).
2) Burn, J. H. et al : Biological Standardization, Oxford Univ. Press. (1950).
3) Finney D. J. : Statistical Method in Biological Assay, C. Griffin &. Co. Ltd. (1952).

Summary

The assay of insulin by mouse convulsion method was done using ddN and Sm strain mice.
The following results were found :

1) Young ddN strain showed seldom typical convulsion.
2) In the uniform strain, number of dead mice after injection were less than that of ordinary mice from the market.
3) The co-efficients of the dose-response regression were almost similar in both strains.
4) In the experiments at 35°, ED 50 of ddN strain was 3.1 times larger, and Sm strain was 2.5 times larger than that of the ordinary one, while in the experiments at 37°, both ED 50 and the fiducial limits of errors are almost equal in the experiment.
5) From our experiments, it is not necessary to use uniform strain in this method.

Received June 18, 1957.

インシュリンの薬化学的研究（第20報）*

粗マグロインシュリンから単離した結晶性蛋白質について

長沢佳熊，西崎笹夫，平岡孝，**深沢真司**

Pharmaceutical and Chemical Studies of Insulin. XX.

On the Crystalline Proteins Isolated from the Crude Tunna Insulin.

Kakuma NAGASAWA, Sasao NISHIZAKI, Takashi HIRAOKA and Shinji FUKASAWA

まえがきと総括　著者等はまぐろ Stannius 小体から得た粗インシュリン（16 u/mg）につき Scott[1] の方法で結晶化を試みたところ，1部分が六面体結晶となることを認めた（Fig. 1参照）．この結晶（以下 Cryst. TA と称す）は分解点228°(褐変）~250°（黒変)(日局法)（実験2a参照），窒素（N）17.43％（実験2b参照)，亜鉛(Zn) 1.21％（実験2c参照)，ペーパクロマトグラフの Rf 値もインシュリンとほとんど変らず（実験2d 参照)，等電点は6～7である（実験2e参照)．結晶形はStaub[2] 等の得たグルカゴン結晶によく似ているがグルカゴンの生物的作用をほとんど示さず，むしろきわめて弱いインシュリン作用を認めた（実験3参照)．

また同じ試料について実験をくり返したが，結晶化の pH がわずかに異なる pH 6.5 のとき球状結晶を得，(Fig. 2参照）これを Cryst. TB と称することにした．Cryst. TB もまたグルカゴン作用はほとんど認められないが，若干のインシュリン作用を示した（実験3参照)．分解点は 240°（顕微鏡法），窒素（N）17.35 ％（実験2参照）であつた．Cryst. TA と Cryst. TB との関係については現在詳細に研究中である．

実験の部

実験1　結晶の単離方法：マグロ Stannius 小体から抽出した粗インシュリン（16 u/mg）600 mg を N/100-塩酸 15ccに溶かす．燐酸緩衝液 200 cc，水 200 cc および N-塩酸 16 cc 試料溶液を内容 500 cc のフラスコに入れゆるやかにかきまぜる（pH=2.03)．東洋沪紙 No. 5 で沪過後，0.5％塩化亜鉛液 4 cc およびアセトン 40 cc を加える．つぎに N-水酸化アンモニウム溶液を注意深く少量ずつ加えて pH を 6.2 に調節する．この蛋白石濁溶液をガラス棒で器壁をしばらくこすり，4°の冷暗室に放置し，ときどき沈澱の1部をとり顕微鏡で観察した．放置後 40 時間を経過して顕微鏡視野に数個の結晶の存在を確認し（最大径約 15 μ)，結晶は4～5日後さらに若干成長した（最大径約 20 μ)．

この溶液をかきまぜてしばらく放置するとき，速く沈澱する部分には結晶量が多く，上部の乳濁液中には結晶量がきわめて少いことを知り，顕微鏡で注意深く観察しながら結晶量の多い沈澱部分を集め，さらに蒸留水を加えて数回この操作をくり返し，ついにほとんど完全に結晶部分のみを単離し減圧乾燥した（Fig. 1参照)．

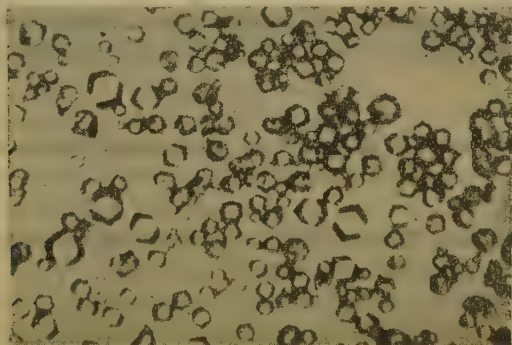



Fig. 1. Crystals isolated from the crude tunna insulin. (Cryst. TA) (×400).

---

* 第19報は本誌75号 9 頁　** 所員外　清水製薬株式会社　*** かつをのインシユリンからも結晶TAにほとんど類似した結晶を得ているが，未だ詳細に検討できなかつた．

また同一試料 250 mg をとり同様に操作して pH 6.5 で冷暗室に放置した結果，球状結晶の存在を認め前と同様に蒸留水を加えて沈降速度の差によりほとんど完全に結晶のみを単離した(Fig. 2 参照).

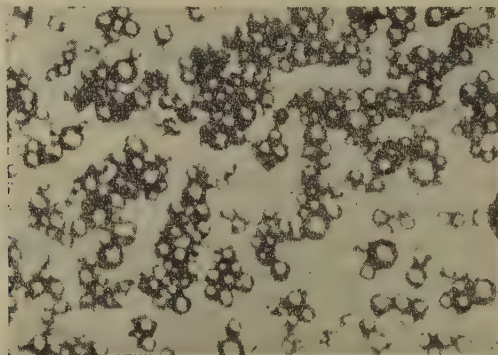



Fig. 2. Crystals isolated from the crude tunna insulin. (Cryst. TB) (×400).

実験2 物理化学的恒数の測定

(a) 分解点：Cryst. TA を日局Ⅵ記載の融点測定装置で測定した結果，228° で褐変，250° で全く黒変した．これを白金板上で加熱するとき気泡を生じ後に白色の残留物を得た．また Cryst. TB は顕微鏡融点測定装置で測定した結果 240° で着色した．

(b) 窒素の含量：アゾトメトリ法[3]で窒素を測定した結果，Cryst. TA は 17.43%，Cryst. TB は 17.35% であつた．

(c) 亜鉛の含量：国際薬局方記載の亜鉛定量法[4]に準拠し Cryst. TA の亜鉛を定量した結果 12.1γ/mg であつた．

(d) ペーパクロマトグラフの Rf 値：第15報の方法[5]により牛のインシュリン結晶，マグロの無晶インシュリンと Cryst. TA を同時に展開した結果，0.28，0.24，0.23であつた．また Cryst. TB は Cryst. TA とほとんど等しいか，やや低い Rf 値を示した．これらはいずれも1つのスポットのみを検出し，しかもニンヒドリン呈色は陽性であつた．

(e) 等電点：Cryst. TA を日局記載のインシュリン溶剤に溶かし，塩酸および水酸化ナトリウム液を少量ずつ加えて沈澱の状態を注意深く観察した．沈澱の最もおこる点のpH をガラス電極で測定した結果，等電点はほぼ 6～7 であつた．

実験3 生物学的検定

(a) 単位の検定：Cryst. TA を米局 XV のインシュリン単位検定法[6]を適用し，20 u/mg と想定して検定した結果約 4 u/mg であつた．(その信頼限界はこの場合の想定単位と実験値とがあまりにもかけ離れていたため非常に大きく，算出できない)．

(b) グルカゴンの検定：Cryst. TA をインシュリン溶剤に溶かし，絶食した家兎2匹にそれぞれ 400γ，800γを耳静脈内に注射し，血糖量の変化を検べた．その結果を Fig. 3 に示す．

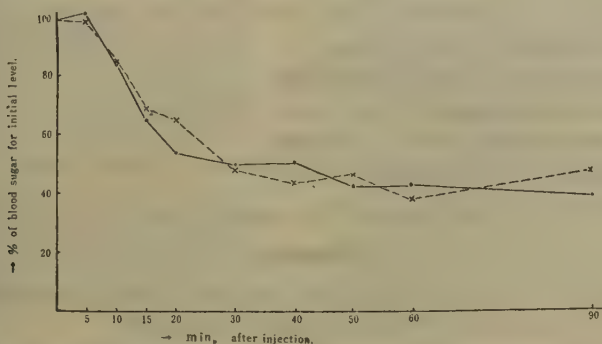



Fig. 3. Assay of blood sugar.
—•— : injected 800 γ/1.9 kg (Body weight).
…×… : injected 400 γ/1.8 kg (Body weight).
These rabbits were fasted for 20 hr. before injection and injected Cryst. TA intraveniously.

この結果からグルカゴン作用はほとんど示さずむしろきわめて弱いインシュリン作用を認めた．もしこの結晶がインシュリン結晶（23 u/mg）だと仮定すると 400 γ 注射の場合では約 9.2 単位，800 γ の場合はで約 18.4 単位の効力をあらわすはずなのである．

また **Cryst. TB** を前と同様に絶食家兎2匹に 200 γ ずつ注射した結果を Fig. 4 に示す．

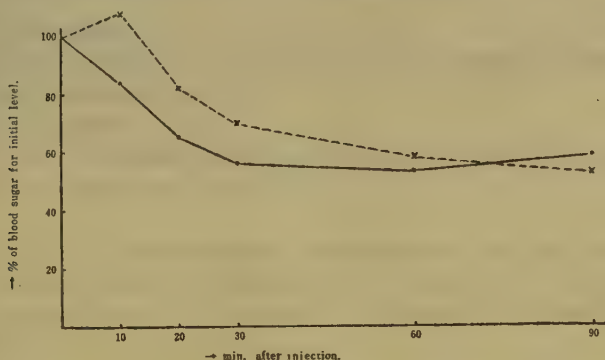



Fig. 4. Assay of blood sugar.
—•— : injected 200 γ/2.3 kg (Body weight).
…×… : injected 200 γ/1.6 kg (Body weight).
These rabbits were fasted for 20 hr. before injection, and injected Cryst. TB intraveniously.

この結果からグルカゴン作用はほとんど認められないが，若干のインシュリン作用を示した．もしこの結晶がインシュリン結晶(23 u/mg) だと仮定すると 200 γ 注射の場合約 4.6 単位に相当する．

実験 4　得量およびインシュリンの回収：Cryst. TA は試料 600 mg (16 u/mg) からほとんど完全な結晶 15 mg，やや無晶形を含むもの 3 mg，無晶形 490 mg，上澄液を塩析により回収したもの 35 mg を得た．（重量回収率：90.5 %）．また Cryst. TB は試料 250 mg (16 u/mg) からほとんど完全な結晶 7 mg，無晶形 180 mg，上澄液を塩析により回収したもの 55 mgを得た（重量回収率：97%）．
いずれも結晶の収率約 3 % である．

文　　献

1) Scott, D. A. : Biochem. J. 28 1592 (1934)
2) Staub, A. et al. : *J. Biol. Chem.* 214 619 (1955)
3) 岩崎　憲：生化学，23 4 (昭26)
4) International Pharmacopoeia : Vol. Ⅱ, 274 (1955)
5) 長沢佳熊，西崎笹夫：本誌 74 171 (昭31)
6) 米局 XV p 339−342

Summary

The authors isolated two inactive proteins (Cryst. TA and Cryst. TB), which are different in their crystalline form, from fhe crude tunna insulin (see Fig. 1 and Fig. 2).

Crystals TA decomposed at 228° (turned into brown) by the melting point testing method of the Japanese Pharmacopoeia, and contained 1.21 % zinc (Zn), and 17.43 % nitrogen (N), and Rf value was close to that of tunna insulin.

Crystals TB decomposed at 240° (partly turned into brown) by microscope method, and contained 17.35 % nitrogen (N).

Received June 18, 1957.

インシュリンの薬化学的研究(第21報)*
アイソフェンインシュリンの電気泳動について

長沢佳熊,西崎笹夫

Pharmaceutical and Chemical Studies of Insulin. XXI.
On the Electrophoreisis of Isophane Insulin.

Kakuma NAGASAWA and Sasao NISHIZAKI

総括 アイソフェインシュリンの結晶をpH 3.5およびpH 2.2の酸性緩衝液に溶かし,また同時に対照として牛インシュリン結晶,プロタミン,インシュリンとプロタミンの混合試料についても電気泳動を行い比較した.pH 3.5の酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液中ではその上昇側ではインシュリンとプロタミンは分離して移動しない.下降側では若干の分離が見られるが,これはアイソフェンインシュリンの泳動速度とインシュリンとプロタミンの混合試料のそれとは明らかに異なるから(Fig. 1およびFig. 2参照),pH 3.5の緩衝液中でアイソフェンインシュリン中のインシュリンとプロタミンが泳動前にそれぞれ独立して存在しているとは考えられない.しかしpH 2.2の塩酸-塩化カリウム緩衝液中では上昇,下降側ともにインシュリンとプロタミンは分離して泳動することを確かめたから(Fig. 3およびFig. 4参照),pH 2.2の緩衝液中では2成分はそれぞれ独立して存在しているのであろう.

実験の部

1) 緩衝液の調製

(a) 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液

5 M-塩化ナトリウム 32 cc,2 M-酢酸ナトリウム10 cc および 3.5 M-酢酸 200 cc を混和し,蒸留水を加えて $2l$ とする.(pH : 3.5,イオン強度 : 0.44).

(b) 塩酸-塩化カリウム緩衝液

5 M-塩化ナトリウム 16 cc,1 M-塩酸 7.52 cc および 1 M-塩化カリウム 92.5 cc を混合し蒸留水を加えて $1l$ とする.(pH : 2.2,イオン強度 : 0.18).

2) 試料の調製

(a) アイソフェンインシュリン注射液を遠心分離した後蒸留水を加えて洗い,ふたたび遠心分離し沈澱をpH 3.5の緩衝液〔1),a〕に溶かして試料とした.別に結晶インシュリンおよびプロタミンをそれぞれ緩衝液〔1),a〕適当量に溶かした.これら3検体をセロファン紙で2昼夜4°の冷暗室でpH 3.5の酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液〔1)a〕に対して透析した.

(b) またアイソフェンインシュリン注射液30 ccを前記に従い遠心分離した後蒸留水を加えて洗いふたたび遠心分離し沈澱をpH 2.2の緩衝液〔1),b〕に溶かして試料とした.別に結晶インシュリンプロタミン50 mgずつをとり緩衝液〔1),b〕9 ccずつに溶かし,これら3検体を前記同様pH 2.2の緩衝液〔1),b〕に対して透析した.

(c) プロタミンとインシュリンの混合試料は(a),(b)におけるインシュリン,プロタミンの試料を等量混合して試料とした.

3) 電気泳動試験

常法により前記試料を日立製作所製 HT-B 型により 12.5 mA で泳動し,それらの泳動図を撮つた.

アイソフェンインシュリンはpH 3.5の緩衝液〔1),a〕では1成分として存在する(Fig. 1,Fig. 2参照).しかしpH 2.2の緩衝液〔1),b〕では2成分として存在し,その2成分の泳動はインシュリンとプロタミンの混合液と同様に動作し,しかもFig. 4の泳動速度の点からもこのことが察知される.

(a) pH 3.5の緩衝液〔1),a〕中での泳動についてその泳動図をFig. 1に示し,上昇法における泳動速度をFig. 2に示す.

---

* 第20報は本誌75号17頁

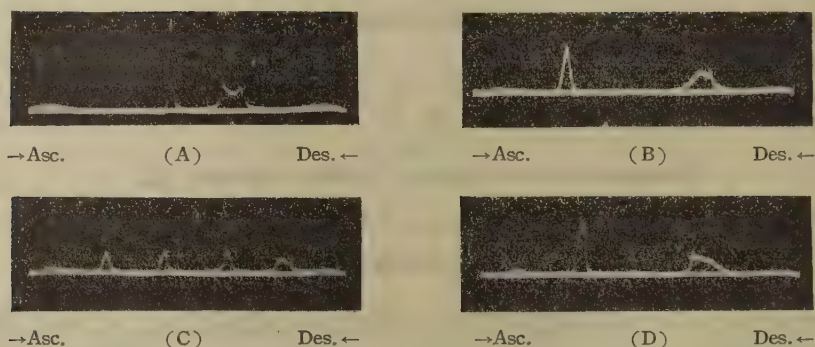



Fig. 1. Descending and ascending electrophoreisis patterns of Protamine, Isophane insulin, the mixture of Protamine and Insulin, and Insulin, in 0.44 ionic strength acetic acid-sodium acetate buffer of pH 3.5.

(A) : Protamine, 30 min.

(B) : Isophane insulin, 40 min.

(C) : Mixture of protamine and insulin, 30 min.

(D) : Insulin, 60 min.

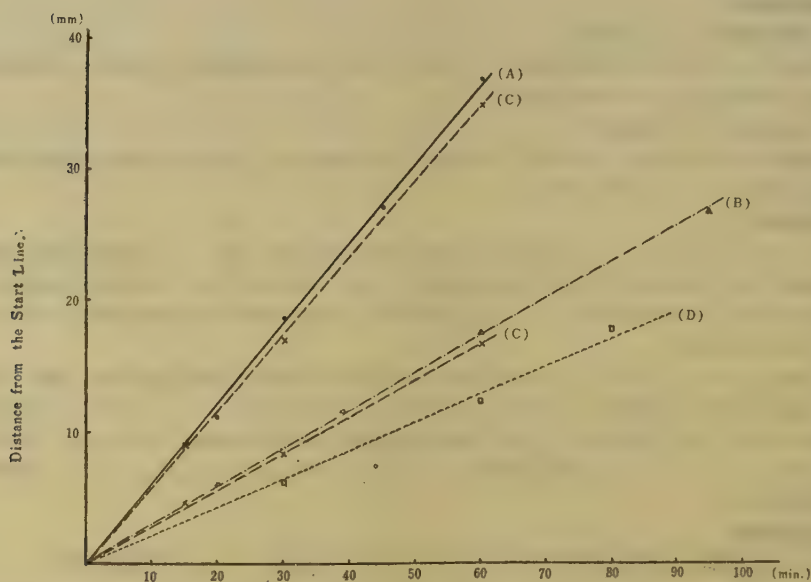



Fig. 2. Comparison of mobility in ascending. (pH : 3.5)

(A) : Protamine.

(B) : Isophane insulin.

(C) : Mixture of protamine and insulin.

(D) : Insulin.

（b） pH 2.2 の緩衝液〔1), b〕中での泳動についてその泳動図を Fig. 3 に示し，上昇法における泳動速度を Fig. 4 に示す．

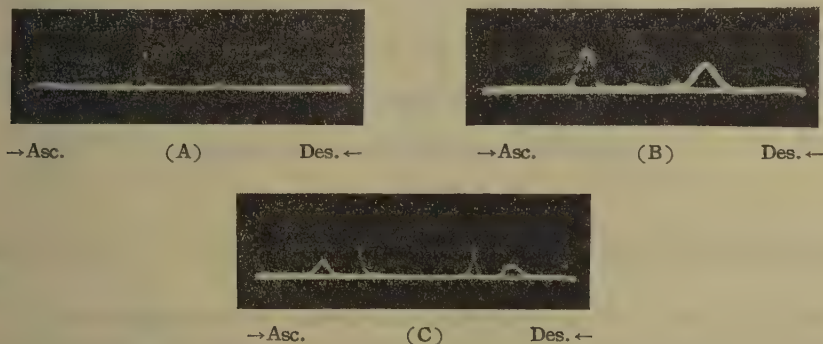



Fig. 3. Descending and ascending electrophoreisis patterns of Protamin, Isophane insulin, the mixture of Protamine and Insulin, in 0.18 ionic strength hydrochloride-potassium chloride buffer of pH 2.2.

(A) : Protamine, 60 min.

(B) : Isophane insulin, 90 min.

(C) : Mixture of protamine and insulin, 60 min.

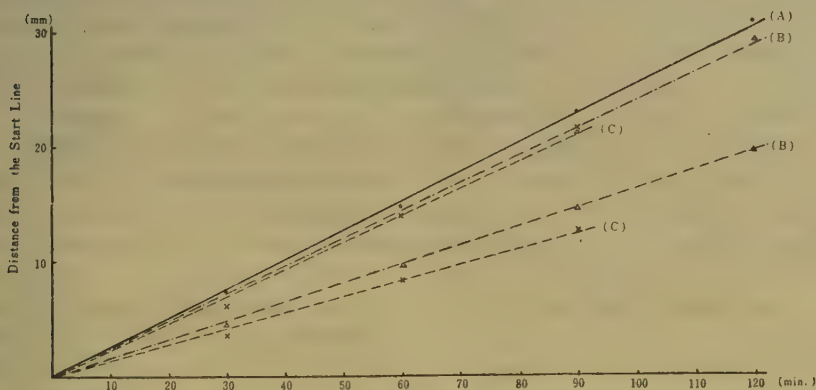



Fig. 4. Comparison of mobility in ascending. (pH : 2.2)

(A) : Protamine.

(B) : Isophane insulin.

(C) : Mixture of protamine and insulin.

終りに電気泳動操作につきお世話頂いた当所食品部竹内末久技官に謝意を表する．

Summary

By the experiment of the electrophoreisis with isophane insulin, insulin, protamine and their mixture in the acetic acid- sodium acetate buffer (pH 3.5) and hydrochloride-potassium chloride buffer (pH 2.2) solution, the authors found that, in the pH 3.5 buffer, isophane insulin moved as one component, while in the pH 2.2 buffer, it moved as two.

Received June 18, 1957.

ジメチルグリオキシムによる有機化合物の呈色反応（第4報）*

若干のピリミジン，プリン塩基の検出法

城 戸 靖 雅

Color Reaction of Organic Compounds with Dimethylglyoxime. IV.

Detection of Some Pyrimidines and Purines.

Yasumasa Kido

著者はウラシル，キサンチンの試験規格設定の必要に迫られ，それについて検討した結果若干の知見を得たので報告する．

ピリミジン，プリン塩基の呈色反応は，(1)酸化還元反応，(2)酸化縮合反応，(3)ジアゾカップリング反応，(4)その他の反応に大別できる．(1)の方法は燐モリブデン酸[1]，燐タングステン酸－燐モリブデン酸[2]，砒素タングステン酸[3]フェリシアン化カリウム－フェロシアン化カリウム[4]等の酸化還元試薬を用いる方法で，鋭敏ではあるが特異性は乏しい．(2)の反応は塩素，又は塩素酸カリウムと塩酸[5),6),8)]，臭素[6),8)]，ヨウ素[7]，クロラミンT[8]，過酸化水素[8]，硝酸[9]等を用いるいわゆる Murexide 反応で特異性，鋭敏度はかなり優れている．又酸化成績体の焦性ブドー酸とo-ニトロベンゾアルデヒド[10]の縮合反応は敏鋭ではあるが，適用範囲が狭く，(3)の芳香族ジアゾニウム塩によるカップリング反応[11]は反応の性質上(1)のように鋭敏ではあるが特異性は低い．その他コバルト錯塩形成反応[12]，還元成績体のアルカリ[13]による呈色反応，クロル化後バリウム塩[14]として呈色させる反応等があるが，特異性，鋭敏度の点から，あるいは反応に長時間を要するなど，優れた反応とは云い難い．

ピリミジン，プリン塩基のような化合物はその構造からみて，基本構造をあまり変化させずに特異的に発色させることはかなり困難である．そこで著者は特異性と鋭敏度を適度に持合わせた反応として次のような方法（実施法Ⅰ，Ⅱ）を考案した．すなわちピリミジン[15]プリン[16]塩基は酸化剤によつて尿素又はその誘導体を生成するので，先ず酸性またはアルカル性で，過酸化水素で試料を酸化して尿素化合物とした後，ジメチルグリオキシムとチオセミカルバジドを作用させて赤色～赤紫色に呈色させた．酸性酸化ではプリン塩基に陽性でピリミジン塩基に陰性のことが多いので，プリン塩基の検出法として適当である．またアルカリ性酸化では，酸性の場合とは逆にピリミジン塩基に陽性なのでピリミジン塩基の検出法として適当である．これらの方法は反応の性質上，尿素化合物，オキシベンゾアルデヒド類[17]，バルビタール類，ブロムワレリル尿素，グアニジン類，アルギニン，クレアチン等[18]の含窒素有機化合物にも反応陽性となるが，これら化合物は過酸化水素処理を行わなくても，尿素化合物及びオキシベンゾアルデヒド類は塩酸酸性下ジメチルグリオキシムとチオセミカルバジドによつて，またバルビタール類，ブロムワレリル尿素，グアニジン類，アルギニン及びクレアチン等は苛性アルカリ性で加水分解した後，塩酸酸性でジメチルグリオキシムとチオセミカルバジドによつて反応陽性であるから，ピリミジン，プリン塩基との判別が行える．

実 験 の 部

実施法Ⅰ 試料の微量又はその水溶液の1滴に30% 過酸化水素[註1)] 1滴，塩酸1滴を加え，沸騰水浴中で5分間加熱後，ジメチルグリキシム試液（ジメチルグリオキシム 0.3g を塩酸 10ml に溶かす[註2)]）3滴及びチオセミカルバジド試液（チオセミカルバジド 0.1g を水 3 mlに加熱して溶かし，エチルアルコール 7 ml を加えてふりまぜた後冷却，必要ならば沪過し，沪液を使用[註2)]）1滴を加え5分間沸騰水浴中で加熱する．

実施法Ⅱ 試料の微量又はその水溶液の1滴に 30% 過酸化水素1滴，N-水酸化ナトリウム液1滴を加え沸騰水浴中で5分間加熱後，ジメチルグリオキシム試液3滴，チオセミカルバジド試液1滴を加え，5分間沸騰水浴

---

* 第3報；大熊，城戸：薬誌，76，894 (1956).

註 1. 3％過酸化水素の使用は鋭敏度を低下する．

註 2. 用時調製．

中で加熱する.

これらの方法を各種化合物約250検体について実施したところ，前記化合物群のほか若干のチオ尿素類，及びチアゾール誘導体が反応陽性であつた．なおピリミジン，プリン塩基その他若干の化合物について行つた実験結果をTable Ⅰ，Ⅱに示す．

Table I. Color Reaction of Pyrimidines, Purines and Some Organic Compounds with Hydrogen Peroxide, Dimethylglyoxime and Thiosemicarbazide.

Compound	Color	
	Procedure Ⅰ	Procedure Ⅱ
Ribonucleic acid	R	R
Desoxyribonucleic acid	R	R
2,4-Dioxopyrimidine (Uracil)	OR	RV
2,6-Dioxo-5-nitropyrimidine	RV	RV
2,6-Dichloro-4-methyl-5-nitropyrimidine	RV	RV
2-Amino-4-methylpyrimidine	1-O	Y
2-Amino-6-methylpyrimidine	1-O	Y
2-Amino-4,6-diethoxy-5-methylpyrimidine	Y	Y
2-Amino-4,6-dipropyl-5-methylpyrimidine	Y	Y
2-Amino-4,6-dichloropyrimidine	1-O	Y
2-Amino-4,6-dichloro-5-ethylpyrimidine	Y	Y
2,4,6-Triaminopyrimidine	Y	Y
2-Methyl-4-amino-5-ethyl-6-ethoxypyrimidine	Y	Y
2-Methyl-4-amino-5-ethyl-6-chloropyrimidine	Y	Y
2,4-Dimethyl-5-ethyl-6-hydroxypyrimidine	Y	Y
2,6-Dioxopurine (Xanthine)	RV	R
2,6,8-Trioxopurine (Uric acid)	RV	RV
1,3,7-Trimethylxanthine (Caffeine)	RV	O
1,3-Dimethylxanthine (Theophylline)	RV	R
3,7-Dimethylxanthine (Theobromine)	RV	O
Theophylline ethylenediamine (Amynophylline)	RV	RO
Theobromine sodiumsalicylate (Diuretine)	RV	RO
Methylthiourea	R	R
p-Ethoxyphenylthiourea	RV	RV
2-Aminothiazole	RV	RV
2,4-Dihydroxythiazole	RV	RV
Urea*	RV	RV
o-Oxybenzaldehyde*	RV	RV
p-Oxybenzaldehyde*	RV	RV
4-Oxy-3-methoxybenzaldehyde*	Br	RV
3,4-Methylenedioxybenzaldehyde*	RV	RV
Bromvalerylurea**	RV	RV
Sodium diethylbarbiturate**	RV	R
Sodium phenylethrylbarbiturate**	Y	R
Diallylbarbituric acid**	Y	R
Guanidine**	O	R
Aminoguanidine**	R	R

Creatine**	Y	R
Arginine**	O	R

O : Orange, R : Red, V : Violet, Y : Yellow.

* Without treatment of hydrogenperoxide, these compounds color with dimethylglyoxime and thiosemicarbazide.

** Without treatment of hydrogenperoxide, these compounds color with dimethylglyoxime and thiosemicarbazide after hydrolyzation with sodium hydroxide.

Table II. Limit of Detection of Pyrimidines and Purines.

Compound	Limit of Detection (γ)
2,4-Dioxopyrimidine	6.0 (Procedure Ⅱ)
2,6-Dioxopurine	3.0 (Procedure Ⅰ)
1,3-Dimethylxanthine	4.0 (Procedure Ⅰ)
3,7-Dimethylxanthine	3.5 (Procedure Ⅰ)
1,3,7-Trimethylxanthine	3.0 (Procedure Ⅰ)
Theophylline ethylenediamine	4.0 (Procedure Ⅰ)
Theobromine sodiumsalicylate	5.0 (Procedure Ⅰ)

結　　論

ピリミジン塩基は水酸化ナトリウムアルカリ性で過酸化水素酸化を行つた後，塩酸酸性でジメチルグリオキシムとチオセミカルバジドで赤色～赤紫色に呈色する.

プリン塩基は塩酸酸性で過酸化水素酸化を行つた後，ジメチルグリオキシムとチオセミカルバジドで赤色～赤紫色に呈色する.

終りに御指導並びに御校閲を賜つた特殊薬品部長長沢佳熊博士，御指導を賜つたもと本所所員大熊誠一氏に感謝する。なお試料の一部を分与下された東京工業大学研究生田村光氏，過酸化水素を提供された江戸川化学株式会社に感謝する.

文　　献

1) Daoust R. A. : *J. Am. Pharm. Assoc.* 42, 744 (1953).
2) Williams J. N. : *J. Biol. Chem.* 184, 627 (1950).
3) Soodak M., Pircio A., Cerecedo L. R. : *J. Biol. Chem.* 181, 713 (1949).
4) Bonino R. C. d' A. deC. : *Rev. asoc. bioquim. argentina.* 15, 125 (1948) ; C. A. 43, 5904-g
5) Fischer E. : *Ann.* 215, 310(1882). Johnes W. : *Z. Physiol. Chem.* 29, 20 (1900).
6) Gemeinhardt K. : *Pharm. Ztg.* 85, 218 (1949) ; C. A. 43, 6785-d
7) Knott E. B. : *J. Soc. Chem. Ind.* 60, 313 (1941).
8) Morgan C. E., Opolonick N. : *Ind. Eng. Chem.*, Anal. Ed. 17, 526 (1945).
9) Fischer E. : *Ber.* 30, 2226 (1897).
10) Johnson T. B., Baudisch O. : *J.Am. Chem. Soc.* 43, 2670 (1921).
11) Burian R. : *Ber.* 37, 698 (1904) ; Pauly : *Z. physiol. Chem.* 42, 516 (1904) ; Johson T. B. : *J. Biol. Chem.* 5, 163 (1909) ; Fischer E. : *Z. physiol. Chem.* 60, 69 (1909) ; Hunter G. : *Biochem. J.* 30, 745 (1936) ; Sanchez J. A. : *Bol. soc. quim. Peru.* 9, 197 (1943).
12) Holt W. L., Mattson L. N. : *Anal. Chem.* 21, 1389 (1949).
13) Kossel A. : *Ber.* 20, 3356 (1887) ; *Z. physiol. Chem.* 12, 241 (1888).
14) Johnson T. B. : *Science* 98, 90 (1943) ; C. A. 37, 5338-1

15) Pfaltz M. H., Baudish O. : *J. Am. Chem. Soc.* 45, 2972 (1923) ; Baudisch O. : *J. Am. Chem. Soc.* 46, 184 (1924) ; Baudisch O. : *Ber.* 54, 406 (1921) ; Baudisch O. : *J. Biol. Chem.* 64, 233 (1925)
16) Rochleder F. : *Ann.* 63, 201 (1847) ; Fischer E. : *Ber.* 14, 1912 (1881) ; *Ann.* 215, 315(1882); Jolles A. : *Ber.* 33, 2120 (1900).
17) 大熊：薬誌, 75, 1291 (1955).
18) 大熊, 城戸：薬誌, 76, 894 (1956).

Summary

Some pyrimidines and Purines color red to reddish violet with dimethylglyoxime and thiosemicarbazide after oxidation with hydrogenperoxide in sodiumhydroxide or hydrochloric acid medium.

Received June 18, 1957.

ルチン標準品について
(ルチンについて 第4報)

長沢佳熊，鹿島　哲，土屋雅一

Rutin Reference Standard of Japanese Pharmacopoeia (Rutin IV.)

Kakuma NAGASAWA, Tetsu KASHIMA and Masakazu TSUCHIYA

まえがき　ルチン[15]の定量は主として比色法及び分光分析法を用いて行われ，その他クロマトグラフ法も用いられ，その両者を組合せて行なう場合もある．ところがルチンの試料にはどうしてもそのアグリコンであるクエルセチンが含まれている．その両者の吸収スペクトルは極めて似ており，それらの吸収極大の波長もわずか12.5mμの差しかない．そのため分光分析法を用いても試料中のルチンの量を定量することはむずかしい．また適当な試薬を加えて発色させてから比色定量[7][10][12][13][25]しても，両者の発色を大いに違わせることは困難であるから，これによつても正確な定量はできない．そのうえクエルセチンの分子量はルチンの半分ほどであるため，かなり良い試料でもクエルセチンを多く含むものの方がルチンの含量がみかけ上多いように定量される傾向もあり，また100%以上の含量を示す結果にもなりかねない．

それに対してクロマトグラフ法を用いるとルチンとクエルセチンを完全に分離することも容易である．[4][8][9][11][16][19]しかしそのクロマトグラムを用いて直接定量するとパーセントの誤差はまぬかれない．そこでそのクロマトグラムからそのまま[2]またはルチンのみを溶出して比色定量することが行われている．[11]この方法は装置も簡単なものですみ実用的であると思われる．

しかし第二改正国民医薬品集やN. F. X (1955)[17]など[20][21][22]では試料を分光分析し，つまり純粋のルチン及びクエルセチンの吸収極大の波長における試料の吸光度を測定し，まずその二つの吸光度の比から試料に含まれるクエルセチンの量を見て，その量が1%以下であるときは，ルチンの吸収極大の波長における試料の比吸光係数から直接ルチンの含量を計算し，クエルセチンの量が1%以上のときにはその二つの波長における比吸光係数を用いた一定の計算式からルチンの含量を求めている．しかしこのような方法を用いるときには測定する二つの波長が近接しているから，用いる単色光の波長幅を3mμ以下とし，その上波長目盛をよく較正するなど，用いる分光光度計は完全に調整されていなければならない．なお波長幅の方は器械に附属している表からすぐ規正できるが波長目盛は標準波長の知られている光源を用いて較正しなければならない．以上のことを含めてルチンの試料を定量するのに用いる分光光度計を調整するためこのルチン標準品を用いるわけである．ここに日本薬局方標準品を製造するとき調査研究したところを報告する．

実験材料――ルチン標準品（日本薬局方標準品），特に依頼して最良質の槐花から注意して抽出精製したものの中で，よい試験結果を示したものを用いた．五酸化リンを用いた減圧デシケータ中で一週間ほど乾燥し，50 メッシュのふるいでふるつてから，また一週間以上乾燥した．

N. F. ルチン標準品，次に述べるようなロットのものである．それを五酸化リンを用いアブデルハルデン乾燥器で室温で1日以上乾燥した．

The National Formulary N. F. Reference Rutin, Lot No. ERRL-226-39. This bottle contains approximately 1 Gm. of pure Rutin intended for use in the adjustment of the spectrophotometer used in the official N. F. Assay for rutin. Distributed by the Committee on National Formulary of the American Pharmaceutical Association, 2215 Constitution Ave., N. W., Washington 7. D. C.

N. F. 規格ルチン，Mann Research Laboratories, Inc., New York 6, N. Y. 製造の Rutin N. F. # 104361 (Mann Assayed Biochemicals) をアブデルハルデン乾燥器で前に述べたようにして乾燥した．

エタノール，無水エタノール(一級) 1 l について 12N 硫酸 25cc を加え還流冷却器をつけ数時間水浴上で沸騰さ

---

* 第3報，鹿島，太幡：本誌，71，35 (1953)．

せてから蒸溜する．溜液1lについて10gの硝酸銀を溶かしてから，20gの水酸化カリウムを加えよく振りまぜてから一昼夜放置する．それを数時間おだやかに沸騰させてから生成する酸化銀を除き，塩化カルシウム管をつけた共通すり合せの蒸溜装置で蒸溜する．[14)]

このようにしてつくつた無アルデヒドエタノールを次に脱水する．それにはアルミニウム箔をエーテルで充分に洗つて附着している油脂類を除き，稀水酸化ナトリウム液に浸して盛んに水素が発生するまで表面を腐蝕させる．これをできるだけ少量の水で洗液が弱アルカリ性になるまで洗う．これを1%昇汞溶液に2分間浸し速かに水，エタノールついでエーテルで洗い，沪紙の間にはさんで速かに乾燥する．よくできたアルミニウムアマルガムはこの時強く発熱する．

このアマルガムを前記の無アルデヒドエタノールに加えおだやかに加温すると盛んに水素を発生する．アマルガムが残つているのに水素の発生が止むようになるまで処理をつずけ，生成する水酸化アルミニウムを除き塩化カルシウム管をつけた共通すり合せの蒸溜装置で蒸溜する．[23) 24)]

エタノールの濃度は容積で表わし，それは比重で定めた．95%，90%，85%及び80%（v/v）エタノールの比重（d_4^{25}）はそれぞれ0.8114，0.8292，0.8448及び0.8593としてつくつた．[6)]

酢酸，特級氷酢酸に三酸化クロムを加えて蒸溜し，中間の部分を冷却して再結晶し，それに無水酢酸を加えて再蒸溜した．

実験方法　ルチン標準品（日本薬局方標準品），N.F.ルチン標準品及びN.F.規格ルチンをそれぞれ約50mgとつて精密に秤り，熱い無水エタノール約10ccに溶かし，ガラス沪過器で沪過し，沪過器を熱いエタノールで洗い沪液及び洗液を合し，冷後95%エタノールを加えて，その液の100ccがルチン標準品1～1.5mgに対応するようにつくる．このときあらかじめ最終稀釈液100ccにつき0.02N酢酸1ccを含むように酢酸を加える．次にベックマン分光光度計DU型を用い波長幅が3mμ以下になるように，かつできるだけ狭くなるようにそのスリット幅を調節し，95%エタノール99cc及び0.02N酢酸1ccを含む溶液を対照として波長310mμから430mμまでの吸収スペクトルを求め，特に362.5mμ及び375.0mμ附近は詳しく測定した．また95%エタノールの代りに90,85,80,60,20,及び5%エタノールを用いても測定を行つた．

測定に用いた分光光度計の波長目盛は水銀燈を用いて較正したものである．光源にはタングステンランプを用い，その光を安定させるため鉄共振の電源安定装置とBattery power regulator及び6V,240 AHの蓄電池を組合せて用いた．受光部には光電子増倍管を用い，スリット幅は362.5mμ及び375mμ附近では0.015mm（有効波長幅約0.1mμ）で測定を行つた．試料液を入れる容器は石英製を用いたが，その光路の長さはそれぞれ0.999，0.998及び0.997cmである．

ペーパークロマトグラフ，試料及びクエルセチン並びにそれらの混合物を，15%酢酸水溶液を展開溶媒として，その溶媒で一度洗つた東洋沪紙No.50またはWhatman No.1を用い，室温で下降法でクロマトグラフを行つた．各試料を0.1，0.2，0.3，0.5，1，2，5，10，20，30，50及び60γをとり適当に組合せて用いた．

実験結果　ルチン標準品，N.F.ルチン標準品及びN.F.規格ルチンの定量値は95%エタノールを溶媒に用いて分光分析すると，それぞれ99.3，98.6及び100.2%と求められた．またそれらの試料の375.0mμ（純クエルセチンの吸収極大の波長）及び362.5mμ（純ルチンの吸収極大の波長）における吸光度の比はそれぞれ0.872，0.871及び0.877であつたから，N.F.規格ルチンはクエルセチンがわずかに多いような傾向を示したが，それでもその比が0.875±0.004の枠内に入つているからクエルセチンの量が1%以下という規格の中に入つている．

溶媒として95%エタノールの代りに90%エタノールを用いると前の場合より0.3～0.5%程度高い定量値を示し，85%エタノールを使うと0.2～0.8%低い値を示した．

Table I，II及びIIIの吸光度は容器のブランクの差を補正した値である定量値の最初の値は純ルチンの比吸光係数32.55より計算し，それにまず容器の光路の長さの補正を入れ，ついで温度による溶液の膨脹の補正を加えた定量値を正しいものとした．

またN.F.の方法[17)]により波長560，590，620，655及び690mμにおける吸光度も併せて測定したが，それらは皆ほとんど零であつた．そのことは各試料がクロロフィルや赤い系統の色素（アントチアン類など）をほとんど含んでいない証拠である．

Table I. Assay of J. P. Rutin Reference Standard by Spectrophotometry (24°C)

(1.068mg/100cc, 0.01068g/l)

Wave length, mμ \ Solvent	95% C_2H_5OH	90% C_2H_5OH	85% C_2H_5OH
362.0	0.343	0.344	0.3395
362.5	0.343	0.344	0.340
363.0	0.342	0.343	0.339
374.5	0.300	0.302	0.300
375.0	0.299	0.300	0.298
375.5	0.2945	0.294	0.292
$A_{362.0}/A_{374.5}$	0.875	0.878	0.884
$A_{362.5}/A_{375.0}$	0.872	0.872	0.876
$A_{363.0}/A_{375.5}$	0.861	0.857	0.861
Assay	98.66%	98.95%	97.80%
Corrected (Cell)	98.8%	99.3%	98.0%
(Thermal)	99.3%	99.8%	98.5%
Blank of Cell (95% C_2H_5OH)			
362.5mμ	0.003	0.007	0.001
375.0mμ	0.003	0.008	0.000
Rutin (95% C_2H_5OH Solution)			
362.5mμ	0.343	0.347	0.340
375.0mμ	0.299	0.303	0.295

Table II. Assay of N. F. Reference Rutin by Spectrophotometry (24°C)

(1.130mg/100cc, 0.01130g/l)

Wave length, mμ \ Solvent	95% C_2H_5OH	90% C_2H_5OH	85% C_2H_5OH
362.0	0.359	0.360	0.359
362.5	0.360	0.3605	0.359
363.0	0.360	0.360	0.359
374.5	0.314	0.315	0.316
375.0	0.3135	0.315	0.315
375.5	0.310	0.3105	0.310
$A_{362.0}/A_{374.5}$	0.875	0.875	0.880
$A_{362.5}/A_{375.0}$	0.871	0.874	0.877
$A_{363.0}/A_{375.5}$	0.861	0.861	0.864
Assay	97.88%	98.00%	97.60%
Corrected (Cell)	98.0%	98.3%	97.8%
(Thermal)	98.6%	98.9%	98.4%

Table III. Assay of Rutin N.F. by Spectrophotometry (25°C)
(1.126mg/100cc, 0.01126g/l)

Wave length, mμ \ Solvent	95% C_2H_5OH	90% C_2H_5OH	85% C_2H_5OH
362.0	0.364	0.365	0.363
362.5	0.365	0.3655	0.364
363.0	0.363	0.364	0.362
374.5	0.321	0.320	0.3205
375.0	0.320	0.3195	0.319
375.5	0.314	0.314	0.316
$A_{362.0}/A_{374.5}$	0.882	0.877	0.883
$A_{362.5}/A_{375.0}$	0.877	0.874	0.876
$A_{363.0}/A_{375.5}$	0.866	0.863	0.873
Assay	99.59%	99.73%	99.31%
Corrected (Cell)	99.7%	100.0%	99.5%
(Thermal)	100.2%	100.5%	100.0%

クロマトグラフ法を行つた結果はTable IVに示す．各試料を 50γ ずつ用いたとき，クエルセチンの含量はその沪紙上の螢光から0.05～2γ程度しか認められなかつたから，試料中のクエルセチンの含量は 0.1～0.4%程度であるものと思われる．用いる沪紙が東洋沪紙のときは必ず溶媒で洗つたものを用いなければ好結果が得られないが，Whatman No. 1 はそのまま用いることができた．

国民医薬品集の純度試験の(1)溶状の試験をすると3種のルチンのいずれもが微量の不純物を残した．その溶液を軽く沸騰させるとすぐ澄明に溶ける．また(2)クロロフイルの試験を行なうとき用いるアルコールの含量が 98%以下であると溶けにくいが，99%以上であると室温 (25～30°C) でも溶ける．

Table IV. Paperchromatography of Rutin and Quercetin by Descending Method
(About 25°C)

	Rutin	Quercetin
Rf value	0.60	0.05
Color	yellow*	yellow*
	brown-black (U.V.)	yellow (U.V.)
Sensitivity	1γ*	0.05γ (U.V.)

Solvent : 15% Acetic Acid, 85 %Water, Paper : Whatman No.1
* Reagent : 1% $AlCl_3$ in ethanol. ** U.V. : Under ultraviolet light.

考　察　まず分光分析に用いる溶媒のエタノールの含水量であるが，ただ単にエタノールといえば，米国及び英国の規格では約95v/v%のことであり，日本では約90v/v%のこととなる．この点は国民医薬品集のルチンの定量法が米国のN.F. (The National Formulary) に基ずいているとすれば当然95%エタノールを用いるべきものであるから，この点を明らかにしておかなければならない．それは90%エタノールを用いたとき測定値が最大となり，85%エタノールまたはそれ以下とエタノールの濃度が低下するにつれて測定される定量値も低下するのが見られたからである．そしてエノタールの含水量は比重その他の方法で調整し，当然そのエタノールはアルデヒドを完全に除いたものを用いなければならない．また同じ精製状態のエタノールを用いないと他の条件が同じでも違つた値が得られたから，溶媒の精製は十分注意して完全に行わなければならない．なお添加する0.02

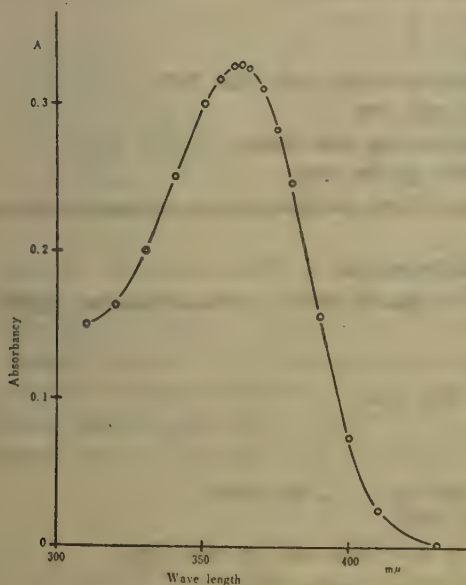



Fig.1 Absorption Curve of Rutin Reference Standard (1.036mg/l in 95% ethanol)

N 酢酸の量またはその濃度の影響については今回は検討しなかつたが，もちろんその量や濃度は一定にしなければ誤差が大きくなる．

分光光度計で測定しているとき光源からの熱の影響を受けて，室温 25°C のとき試料液の温度が 30°C 前後にまで上昇したから，その試料液の温度を一定にして測定する装置を用いることが望ましい．それは 95% エタノールの体膨脹係数は 1°C につき約 0.10% というかなり大きなものであるからである．なおフェノールをエタノールを溶媒に用いて分光分析すると，その吸光度は温度が上昇するにつれてかなり増加することが報告されている．[3)]それはフェノール同志及びフェノールとエタノールの会合の割合が温度の上昇につれて減少するためと思われる．それに対してポリフェノールであるルチン及びクエルセチンについては，その点を検討しなかつたが，フェノールにおけるような大きな違いが起らないと思われるが，やはり注意を必要とし，できるだけ 25°C で測定を行なうのが望ましい．

試料液を入れる容器はシリカ製よりは石英製を用いる方がかなり短波長で測定するため好結果が得られる．また容器に溶媒または試料液を入れて容器のブランクを測定したところ，その値はどちらでもその大きさはおよそ同じであつたが，同じ試料液を各容器に入れてブランクを測定する方が実際の測定に近いから好ましいと思う．

試料にクエルセチンが含まれていると，一般にルチンの含量がみかけ上多いような値がでて，この場合のN.F.規格ルチンの如く 100% を越えることもめずらしくない．そのため一応クエルセチンとルチンの吸収極大の波長における吸光度の比を一定の範囲（0.875±0.004）におさえているが，その吸光度の読みが最後の桁で 1 だけちがつただけでも次に示す例の如く必ずその範囲をこえる値となるから注意して測定する必要がある．

0.300 / 0.342 ＝ 0.878

0.299 / 0.343 ＝ 0.872 （測定値）

0.298 / 0.344 ＝ 0.867

また波長目盛が 0.5mμ（1目盛の半分）狂つているとTable I，II 及び III でわかるように，やはりクエルセチンとルチンの吸光度の比が必ず定められた範囲外に出てしまう．

以上述べてきたことからわかるように，溶媒のエタノールの含水量，その精製の程度，容器のブランク及びその光路の長さ並びに温度条件などを十分考えて規正または補正しなければ，このような比吸光係数から定量値を求めることはかなりの誤差（±1%程度）を生じ易い，その上試料に不純物として吸収スペトルクの極めて類似しているものが含まれているときは，分光分析による定量値はかなり大きい誤差が生ずることを避けることはできない．従つて少くともルチン標準品を用いて分光光度計の調整を十分行つた上，慎重な注意を払つて測定を行わねばならない．

それに対してクロマトグラフ法を用いれば試料中のクエルセチンの量をその沪紙上の螢光から約 0.2% の測定精度で定めることができる．だからその方法を併用すれば試料を簡単な光電比色法で定量しても定量用のルチン標準品を使えば，分光分析法と同程度の精度で定量することができるものと思われる．

なお御協力を得た興和化学東京研究所並びに名古屋工場に謝意を表します．

結　論　ルチンの試料を分光分析法で定量するとき用いるルチン標準品について検討した．その結果，試料の比吸光係数を用いて定量するためには，ルチン標準品を用いて分光光度計を十分調整した上，溶媒のエタノールの精製を完全に行いその含水量を 5% とし測定用容器及び温度による補正を考えに入れて慎重に測定する必要があることを指摘した．またペーパークロマトグラフ法を用いれば，試料中のクエルセチンの量を一定限度内に

押えれば簡単な比色法でも分光分析法と同程度の定量ができるものと思われる.

文献

1) 馬場宏明：紫外線可視線スペクトル，実験化学講座，3，p. 235，丸善，東京，1957.

2) Bradfield, A.E., Food, A.E. : *J. Chem. Soc.*, 1952, 4740.

3) Coggeshall, N.D., Lang, E.M. : *J. Am. Chem. Soc* 70, 3238 (1948).

4) Gage, T.B., et al. : *Anal. Chem.*, 22, 709 (1950), 23, 1582 (1951).

5) Gillam, A.E., Stern, E.S. : "An Introduction to Electronic Absorption Spectroscopy in Organic Chemistry", Edward Arnold, London, 1954.

6) Grossfeld, J. : *Handb. Lebensm.-Chem.*, 2, 1704, Berlin, 1935.

7) Horhammer, L., Hansell, R. : *Arch. Pharm. Berl* 284, 276 (1951) ; *J. Pharm. Pharmacol.*, 4, 588 (1952).

8) 藤瀬新一郎，立田晴雄：日化，73，35 (1952).

9) Ice, C.H., Wender, S.H. : *Anal. Chem.*, 24, 1616 (1952).

10) 今井続雄，古谷潔：薬誌，72，1560 (1952).

11) 鹿島　哲，太幡利一：本誌，71，35 (1953).

12) 刈米達夫，橋本庸平：薬学研究，22，108，467 (1950)；薬誌，71，433 (1951).

13) 掛見喜一郎，宇野豊三，岩間宗弘：薬誌，73，101 (1953).

14) Leighton, P. A; Crary, R.W., Schipp, L.T. : *J. Am. Chem. Soc.*, 53, 3017 (1931).

15) McIroy, R.J. : "The Plant Glycosies", Edward & Co., London, 1951.

16) Naghski, J., Fenske, Jr., C.S., Couch, J.F. : *J. Am. Pharm Assoc.*, Sci. Ed., 40, 613 (1951).

17) N.F.X (The National Formulary), p. 498, 1955.

18) Ibid., p. 717.

19) 大島康義，中林敏郎：農化，24，21 (1951)，25，212，487 (1952).

20) Porter, W.L., Brice, B.A., Copley, M.J., Couch, J.F. : *U.S. Dept. Agr., Bur. Agr. Ind. Chem.*, AIC-159, 6pp (1947) ; C.A. 42, 2057f.

21) Swann, R.V. : *J. Pharm. Pharmacol.*, 1, 323 (1949) ; C.A. 43, 5538c.

22) Turner, Jr., A. : *Anal. Chem.*, 24, 1444 (1952).

23) Walden, P., Ulich, H; Laun, F. : *Z. physik. Chem.*, 114, 275 (1925).

24) Weissberger, A., et al. : "Organic Solvents", 2nd Ed., Interscience, New York, 1955.

25) Wilson, CW., Weatherby, L.S., Bock, W.Z. : *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 14, 425 (1942).

Summary

Rutin Reference Standard of Japanese Pharmacopoeia has been studied.

When the sample is assayed by spectrophotometry, the spectrophotometer has to be perfectly adjusted by using Rutin reference standard. And also the solventethanol has to be purified completely and contain just 5% water, correction of the cells, thermal expansion of the solvent and thermal effect of the spectra have also to be considered. If these conditions do not be satisfied the error of the assay will be greater than one per cent.

Using paperchromatography, quercetin in the sample can be directly determined on the filter paper, and so if the result is adopted, the quantity of rutin in the sample will be easily determined by a simple colorimetry.

Received June 18, 1957

粗製コカイン中のエクゴニンアルカロイド類の定量

朝比奈晴世, 大野昌子

For Determining the Contents of Ecgonine Alkaloids in Crude Cocaine.

Haruyo ASAHINA and Masako ŌNO

まえがき　南米ペルーから粗製コカインが輸入されるに及んで，その品質が使用各製薬会社間で問題になり，試験法特にエクゴニンアルカロイド類の定量法を確立することが要望された．

従来粗製コカイン中のコカインあるいはエクゴニンアルカロイドの定量法として，1938 年国際連盟で採用した Nicholls法[1] があるが，ペルーから輸入される場合は同国立コカ工業試験所(Laboratorios Fiscales de Industrialización de la Coca y Derivados) が，ドイツ，ギルバート研究所(Dr. Gilbert Chemisches Laboratorium) の分析報告書通りの含有量を保証の上出荷されてくるので，同工業試験所在日代表を通じ，ギルバート試験所の試験法の一部を入手し，Nicholls 法とあわせて検討した．

実験の部

試　料　：同一ロットとしてペルーから輸出されたといわれる粗製コカインを，A, B, C 三社から譲受けた．かりにこれらを試料A, B, Cとする．

水分の測定について

試料約500mgを精密に秤り，75°で4時間乾燥すると恒量に至つた．このようにして測定した試料 A, B, C の水分は，それぞれ次のとおりであつた．

Table 1. Loss of Weight on Drying

試　料	水　分	
A	2.83%	2.94[a]%
B	3.78	
C	3.06	

a)　同方法によるA社の測定値

エクゴニンアルカロイド類の定量について

1)　Nicholls 法

国際連盟で採用された Nicholls 法中，容量法について検討した．本法は結合酸の定量によりコカイン含量を求める方法である．定量操作として特に難点はないが，エーテル，石油エーテルの混合溶媒で抽出し，抽出液を溜去して得た残留物（結合酸）が，中性アルコールに完全に溶解しない点が問題であり，フェノールフタレインを指示薬としてこのアルコール液を N/10水酸化ナトリウム液で滴定する場合，終末点を規定する必要がある．われわれの実験結果からは，紅色持続時間15～20分が妥当であると思われた．この方法による試料 A，B，C 及び日本薬局方塩酸コカインの定量値は次のとおりであつた．

Table 2. Cocaine Content by Nicholls' Method

試　料	コカイン含量	
A	88.91%	%
B	88.29	92.0[b]
C	89.53	89.4[c]
塩酸コカイン	84.88	

b)，c）は同方法によるB,C社の定量値

2) Gilbert 法

本法はアルカロイドを抽出し，滴定する方法である．

検体約1gを精密に秤り，250cc の分液漏斗中で稀塩酸10ccおよび水50ccを加えて溶解する．石油エーテル（30～50°）50ccを加え，ついで炭酸ナトリウム飽和液を加えてアルカリ性としたのちふりまぜ，アルカロイドを抽出する．水層を第2の分液漏斗に移し，石油エーテル液は脱脂綿を用いて沪過する．水層は同様にして石油エーテルそれぞれ40，30，30cc ずつで抽出し，先の抽出液に合し，脱脂綿は少量の石油エーテルで洗う．石油エーテル抽出液は無水硫酸ナトリウム1g で脱水したのち注意して石油エーテルを溜去し，残留物をN/10硫酸 40ccに完全に溶かし，N/10水酸化ナトリウム液で過剰の酸を中和する．（指示薬メチルレッド試液）

N/10硫酸1cc＝0.0303gコカイン

(i) 石油エーテルによる抽出について

本法によれば，抽出は50，40，30，30ccの4回，合計150ccの石油エーテルで抽出を行つているが，更に20ccずつ2回抽出を繰返したのちも抽出液の一部は，いずれの場合もマイヤー試液に陽性であり，試料1gからのアルカロイド抽出には，前記条件は不充分であつた．

(ii) N/10硫酸40ccに対する残留物の溶解度

いずれの試料を用いた場合も常温では非常に溶け難く，加温してはじめて殆んど完全に溶かすことができた．

この方法による試料A，B，Cの定量値はそれぞれ次のとおりであつた．

Table 3. Cocaine Content by Gilbert's Method

試　料	コカイン含量
A	82.52%
B	81.20
C	82.45

前記 (i)，(ii) の問題解決のため，又操作をより都合よくするために，試料の採取量を少くし，大量の石油エーテルを使用することなく完全にアルカロイドを抽出することが望ましく，まず日本薬局方塩酸コカインを用いて検討し，次のようにGilbert 法を改良した．

3) 改 良 法

試料約300mgを精密に秤り，分液漏斗に入れ，稀硫酸3ccを加えて溶かし，更に水 20cc を加える．ついで炭酸ナトリウム飽和液を加えてアルカリ性にしたのち，石油エーテル(30～50°)それぞれ25，20，15及び10ccを用いて抽出し，石油エーテル液を合し，あらかじめ石油エーテルで潤した沪紙を用いて沪過する．沪紙は少量の石油エーテルで洗い，洗液は沪液に合し，水浴上で注意して石油エーテルを去り，残留物にN/10硫酸 15ccを加え，加温して溶かし冷後過剰の酸をN/10水酸化カリウム液で滴定する．（指示薬メチルレッド試液2滴）

N/10硫酸1cc＝0.0303g $C_{17}H_{21}O_4N$（コカイン）*

この方法によれば，いずれの試料の場合も石油エーテル4回，合計70cc でアルカロイドの抽出は完全であり，又残留物はN/10硫酸15ccに完全に溶解し，操作が容易であつた．

本法による試料A，B，C及び日本薬局方塩酸コカインの定量値は，次のとおりであつた．

Table 4. Cocaine Content by Modified Gilbert's Method

試　料	コカイン含量	
A	80.81%	%
B	79.99	
C	81.49	
塩酸コカイン	83.52	83.63

* エクゴニンアルカロイド類をコカインとして計算する．

以上の三試験法による定量値を比較すると，試験法による定量値の相違はあるが，各試験法毎にはバラツキはみられない．しかし Nicholls 法は粗製コカインの場合 Gilbert 法に比べて約7％上廻つているが，改良法との差は日本薬局方塩酸コカインの場合約1％にすぎなかつた．一方外国のデータと比較するためにも同じような定量法によるべきであるので Gilbert 法を改良した方法を暫定的な協定法とした．

次に前記三社で同一ロットの粗製コカインについて行つた，種々の試験法によるエクゴニンアルカロイド類の定量値を一括して示す．

Table 5. Other Determinations by Drug Companies

定量法			定量値	
I. コカイン				
Nicholls法	(イ)	旋光度法	94.5%	85.74%
	(ロ)	重量法	100.5	
	(ハ)	容量法	92.0	89.4
A. O. A. C.法				
第I法		滴定法	82.9	
第II法	(イ)	滴定法	82.3	
	(ロ)	重量法	98.0	
	(ハ)	容量法	79.3	
II. エクゴニン				
Nicholls法		旋光度法	52.28	
III. 遊離エクゴニンの定量			0.3	

むすび 粗製コカイン中のエクゴニンアルカロイド類の協定定量法として，Gilbert法を改良した．

試料並びに試験法，及び試験成績を提供された武田薬品工業株式会社，三共株式会社，大日本製薬株式会社，試験法に関して連絡の便をとられたペルー国立コカ工業試験所在日代表の野々宮元蔵氏に感謝する．

文　献

1) *Bulletin of the Health Organisation of the League of Nations*, Vol. 7, Extract No. 6 (1938).

Summary

We are asked to postulate a method of assaying the content of ecgonine alkaloids in raw cocaine imported from Peru. Of the methods mentioned in the literature, we have examined two methods; Nicholls' method in the League of Nations document and the one practically employed in Dr. Gilbert Chemical Laboratory and we have found the latter more satisfactory, but in studying it, some slight changes seemed desirable, for example, 0.3g of crude cocaine was employed in stead of 1g and ecgonine was completely extracted with petroleum from it and as a whole the procedure was simplified. A modification of Gilbert's method has been worked out and this method gives comparatively good results.

Received June 18, 1957

日本産Cannabis sativa L.の抽出エキスの紫外線吸収について

朝比奈晴世, 水町彰吾

Spectrophotometric Study of Extracts from Japanese *Cannabis sativa* L.

Haruyo Asahina and Shōgo Mizumachi

まえがき Cannabis sativa L. はわが国において繊維材料として広く栽培されているが，大麻取締法によってその取扱は規正されている．大麻の麻酔成分が Tetrahydrocannabinol であることは既に明かである[1,2]．われわれは日本産大麻の抽出エキス及び前記成分と類似の構造をもち同様な生理作用を有するPyrahexyl(1-hydroxy-3-n-hexyl-6,6,9-trimethyl-7,8,9,10-tetrahydro-6-dibenzopyran) の紫外部における吸収の測定を試みた．

なお本実験の試料２～４は武田薬品工業東京工場で抽出されたエキスである．

実験の部

(1) **試料** (イ) 試料No. 1について：大麻の葉部を石油エーテル (bp. 60°C～80°C) で抽出したエキスである．(ロ) 試料No. 2－4について：大麻の頂部の葉をアセトンで抽出して製した粗エキスを石油エーテル (特級bp. 30°C～60°C) で温浸して溶解し，一夜放置後沪液に活性炭を加え，４時間振りまぜ，翌日沪過し沪液に更に炭末を加え振りまぜ翌日沪過した．吸着炭末はバット上に展げ，直射日光を遮つて風乾し，沪液は濃縮乾固した．この乾固物を試料No. 2とする．風乾した吸着炭末はメチルアルコールで２回，２時間宛温浸し40°Cに冷却直に沪過し，残留物をメチルアルコールで２時間温浸し一夜放置後沪過し残留物をメチルアルコールで２回，２時間宛温浸し，40°Cに冷却する．各沪液を集めて濃縮乾固し石油エーテルを用いて温浸溶解し，一夜放冷して沪過し，減圧下濃縮乾固した．この乾固物を試料 No. 3とする．この石油エーテルに不溶の部分は再びメチルアルコールに溶解濃縮してエキスとした．このエキスを試料No. 4とする．

(2) **吸収測定用溶媒の精製** (イ) エチルアルコール：無水エチルアルコール 500cc に対して硝酸銀 0.75gを水 1.5ccに溶かしたものを加え良くかきまぜたのち，これに水酸化カリウム1.5gを含水エチルアルコール 7.5cc に溶解したものを追加して静かに数日間放置したのち沪過して蒸溜しこれを生石灰で脱水乾燥後再び蒸溜したものを用いた．(ロ) n-ヘキサン：市販n-ヘキサンを発煙硫酸，濃硫酸，水，水酸化ナトリウム水溶液，水酸化ナトリウムアルカリ性過マンガン酸カリウム水溶液，塩酸々性過マンガン酸カリウム水溶液，水で順次に洗い，五酸化燐で脱水乾燥後蒸溜したものについて分光光度計でベンゼン類の特異吸収がないのを確かめたものを用いた．

(3) **分光光度計** 試料No. 1についてはBeckmanDU型，その他については日立EPU-2型を用いた．

(4) **結果** 測定した結果を第１表及び第１～３図に示す．

Table 1. Absorbance of Extracts Obtained from Japanese Cannabis sativa L. and Pyrahexyl

Sample	Solvent	λmax.			λmin.			Concentration
		mμ	Opt. D.	$E^{1\%}_{1cm}$	mμ	Opt. D.	$E^{1\%}_{1cm}$	g/1
1	Ethanol	280	0.610	117.5	251	0.410	78.8	0.0520
2	Hexane	none	none	none	none	none	none	0.0352
3	Ethanol	282	0.559	192.9	251	0.178	61.4	0.0290
	Hexane	279	0.520	183.6	251	0.175	61.8	0.0283
4	Methanol	281	0.332	129.8	253	0.176	68.8	0.0256

Sample	Solvent	λmax.			λmin.			Concentration
		mμ	Opt. D.	$E^{1\%}_{1cm}$	mμ	Opt. D.	$E^{1\%}_{1cm}$	g/l
Pyra-hexyl	Ethanol	276	0.741	340.1	249	0.224	102.8	0.0218
		229	1.700	780.3				
	Methanol	275	0.742	343.5	248	0.245	113.4	0.0216
		228	1.750	810.3				
	Hexane	275	0.800	335.2	248	0.276	115.6	0.0239
		226	2.000	838.0				

Fig. 1. Absorption Curves of Pyrahexyl, No.2, and No.3 in Hexane

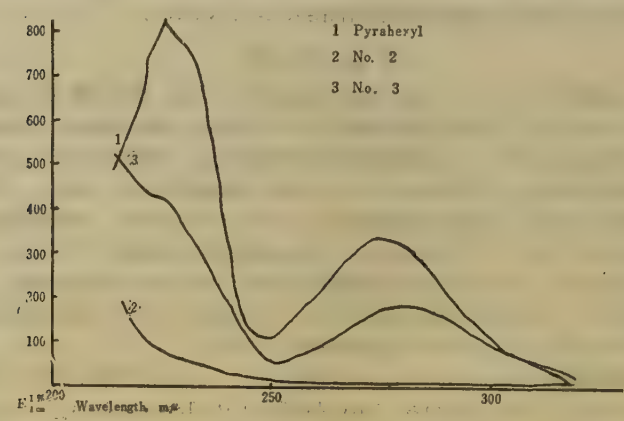



Fig. 2. Absorption Curves of Pyrahexyl, No.1, and No.3 in Ethanol

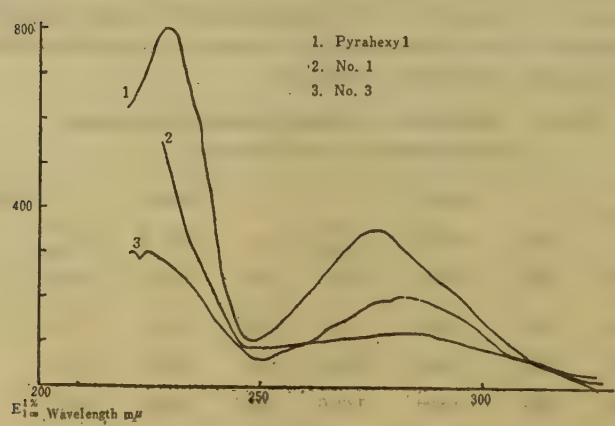
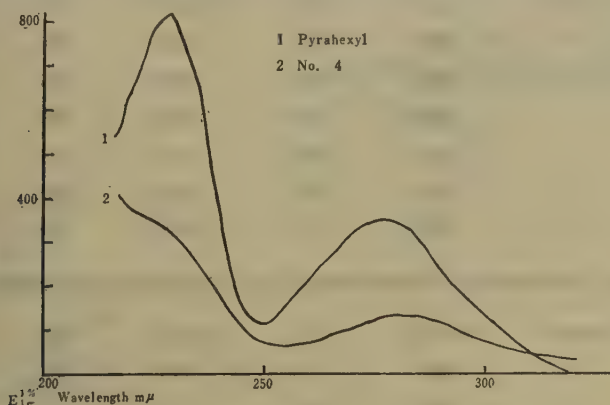
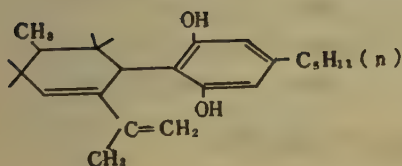
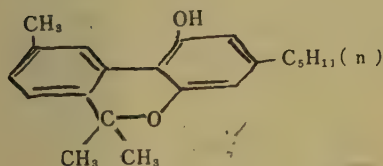
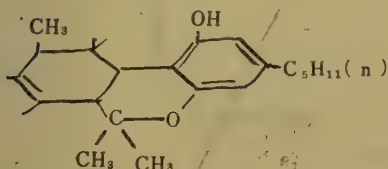



Fig. 3. Absorption Curves of Pyrahexyl and No.4 in Methanol

考　　察

Cannabidiol (I)

Cannabinol (II)

Tetrahydrocannabinol (III)

Cannabis sativa L.の主成分であるCannabidiol (I), Cannabinol (II), Tetrahydrocannabinol (III) 及び類似化合物の紫外線吸収スペクトルはAdams[3]，Todd[4]，によつて測定考察され，これら成分の構造決定に利用された．大麻自体の石油エーテルエキスについてはBiggs[5]，Farmilo[6]によつて紫外線吸収スペクトルが鑑定に応用された。われわれの実験の結果試料No. 2は216～320mμの範囲において最大吸収及び最小吸収は見られず，その吸光度も他のものに比べてわずかであつた．試料No. 1, 3, 4の最大吸収は279～282mμでPyrahexylの最大吸収の一つである275～276mμと大体一致し，最小吸収は251～253mμでPyrahexylの最小吸収248～249mμと大体一致し，又溶媒の差異によるスペクトログラムの差異はほとんど認められなかつた．それゆえ試料No. 1, 3, 4にはTetrahydrocannabinol或いはその類似化合物が含有すると思われる．以上の結果はBiggsの結果（第2表及び第4図参照）と類似しているが，Farmiloの結果（第3表及び第5～6図参照）と相違している．又日本産大麻はCannabidiolの確認反応であるBeam Test（アルコール性水酸化カリウム液による反応）が陰性なので，この反応が陽性であると報告されているCannabis resin "Charas"の入手をまつて更に検討したい．

Table 2. Absorbance of Extracts Obtained from Malayan Cannabis sativa L.

Solution	max. A	E	min. A	E
1	2830	215	2510	98
2	2800	190	2510	105
3	2800	188	2510	128
4	2810	250	2510	135
5	2820	176	2520	113
6	2800	75	2600	63

Table 3. Absorbance of Extracts Obtained from Canadian Cannabis sativa L.

Solution	max. A	E	min. A	E
1	2580	76	2465	68
2	2560	68	—	—
3	2620	156	2450	116
4	2620	96	2450	76
5	none	—	none	—
6	none	—	none	—
7	2600	72	2450	60

Fig. 4. Extract of Cannabis sativa of Malayan Origin

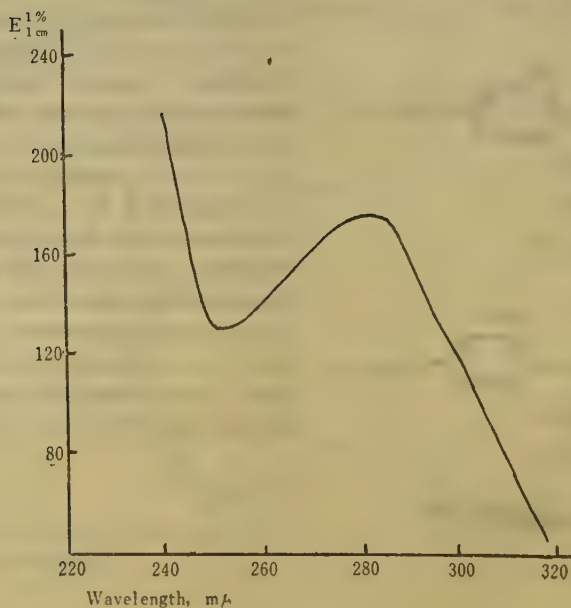



Fig 5. Extracts of Cannabis sativa (Seized in Canada)

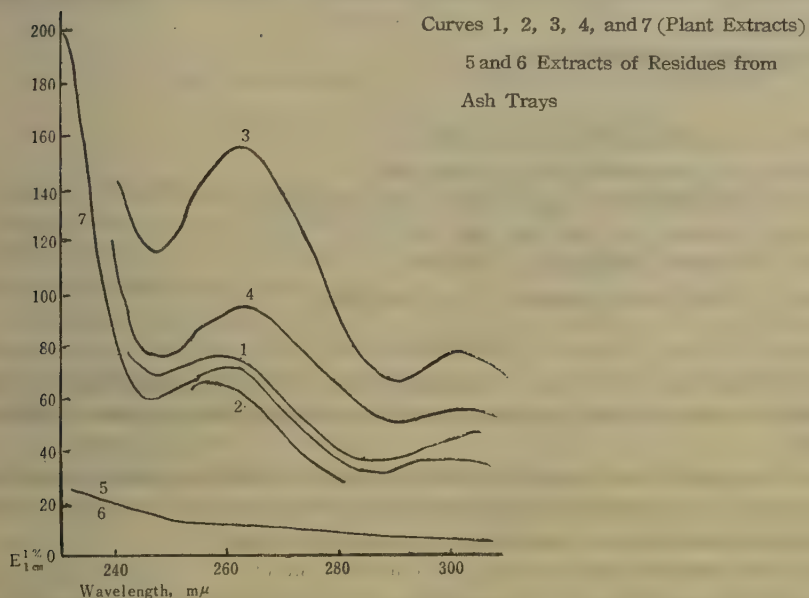
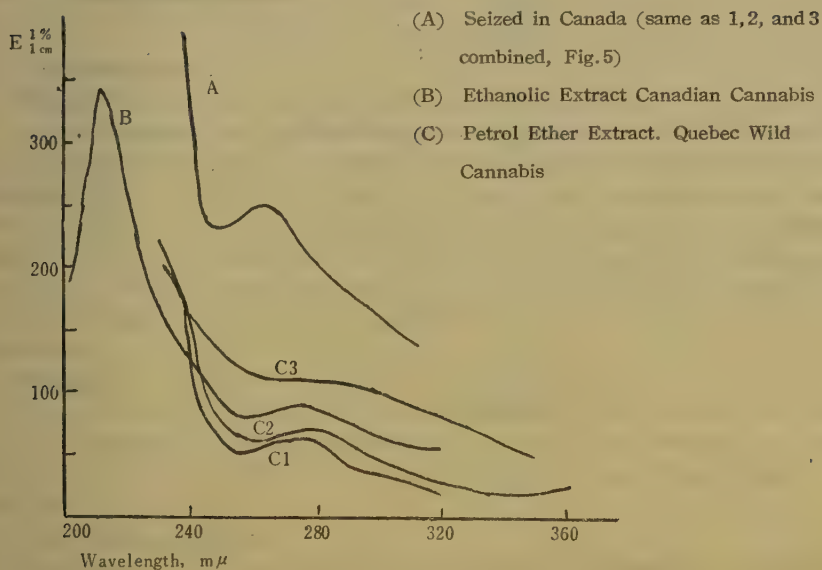



Fig.6. Extracts of Cannabis sativa

分光吸収の測定は大野技官の援助を得た. 御指導を賜つた朝比奈泰彦先生, 大麻の入手に関して種々御便宜を頂いた栃木県立農業試験場南押原分場, 厚生省麻薬課, 抽出作業を引受けられた武田薬品工業東京工場, 西沢, 中山, 兼子, 石川の諸氏, Pyrahexyl を恵与されたAbbott Laboratories, その入手に関して御便宜を頂いた大日本製薬株式会社に謝意を表する.

なお研究費の一部は厚生科学研究補助金を用いた.

文　献

1) Adams, R. : *J. Am. Chem. Soc.*, 62, 2402 (1940).
2) Wollner, H.J. : *J. Am. Chem. Soc.*, 64, 26-29 (1942).
3) Adams, R. : *J. Am. Chem. Soc.*, 62, 732, 1770, 2201, 2215 (1940).
4) Todd, A.R. : *J. Chem. Soc.*, 1940, 649, 1118, 1121
5) Biggs, A. I. : *J. Pharm. Pharmacol.*, 5, 18 (1953).
6) Farmilo, C. : *United Nations Document*, E/CN.7/304 (1955).

Summary

The ultraviolet absorptions of the extracts from Japanese hemp and of the synthetic analogous compound, pyrahexyl, at 216mμ to 320mμ in methanol, and hexane and at 220mμ to 320mμ in alcohol, were measured.

The spectra of the extracts have maxima at 279-282mμ, minima at 251-253mμ and are nearly analogous to the spectrum of pyrahexyl. A corresponding maximum for pyrahexyl is at 275-276mμ and minimum is at 248-249mμ. Pyrahexyl has another maximum at 226-229mμ.

No variation of the absorption curve was observed in different solvents.

From the spectrophotometric study of the Japanese hemp, it is concluded that it contains tetrahydrocannabinol, or an analogous compound; and in general the Japanese hemp is more similar to the Malayan resin reported by Biggs than to the Canadian resin.

Received June 18, 1957

日本産大麻エキスの沪紙クロマトグラフィー

朝比奈晴世，志内賢彦

Paper Chromatography of Extracts from Japanese Hemp.

Haruyo ASAHINA and Yoshihiko SHIUCHI

まえがき　1954年Duquénoisはアンモニア性アセトンを展開液，アルコール性水酸化カリウム液を発色剤とする大麻成分の沪紙クロマトグラフィーを発表した[1].

大麻の主成分のうちアルコール性水酸化カリウム液で発色するのはcannabidiolのみであり[2]他のcannabinol, tetrahydrocannabinolは呈色しない[3)4)].

われわれは日本産大麻の抽出エキスについてこの方法の追試を行つたが，アルコール性水酸化カリウム液での発色はなかつたが，前記三化合物とも陽性[3)4)]であるギブス試液では展開液の上端にスポットが認められた．よつてギブス試液を発色剤として展開液について種々検討した．

試料は昭和31年栃木県立農業試験場南押原分場で栽培された大麻から武田薬工東京工場で抽出されたエキスで，その実験記録によれば次のとおりである．

大麻を細切してアセトンで3日間，3回冷浸後沪過濃縮して粗エキスとした．

試料 1　粗エキスに石油エーテルを加えて温浸した不溶解部分．暗褐色固体．

試料 2　試料1の石油エーテルに活性炭末を加えてふりまぜ沪過した沪液の濃縮物．炭末不吸着部分で細晶を含んだ橙黄色半固状物．

試料 3　試料2の吸着炭末を風乾後メタノールで温浸した．この濃縮物に石油エーテルを加え温浸，一夜放置後，減圧下濃縮したもので暗赤褐色粘稠体である．

試料 4　試料3の石油エーテルに不溶の部分を再びメタノールに溶解し濃縮したもので暗褐色固状エキスである．

実験の部

1. 展開液の検討

東洋沪紙 No. 50 を用い試料3をアセトンに溶かしてつけ 25cm 上昇させた．

フェノール系物質にブタノール酢酸の展開液を用いたのは中林等[5)6)7)]の報告があるがこの場合スポットがほとんど上迄上昇した．例えばブタノールー酢酸ー水（5：1：4），(10：1：5)，(20：1：2）ではいずれもRf 0.9前後となりテーリングした．ブタノールをアミルアルコールにかえたものも同様であつた．塩基性展開液ではブタノールとアンモニア水とふりまぜた上層部を用いたがアンモニアの濃度が高いものでは展開液が上昇した位置までスポットが上昇し濃度が低いものはややスポットが降下したがやはりテーリングがおこつた．ブタノールのかわりにアミルアルコールを用いるとやや良好であつた．又アンモニア水のかわりに炭酸ナトリウム，重炭酸ナトリウム[8)]酢酸ナトリウム等の弱アルカリ水溶液を使用してみたがスポットはテーリングし満足な結果は得られなかつた．

中性展開液ではベンゼンーブタノールー水(1：5：4)，酢酸エチルーブタノールー水（1：5：4)，ヘキサンーブタノールー水（1：15：5)，(5：5：4）の混合展開液ではいずれも上端近く上昇し，ジオキサンー水（1：9）では原点にとどまり，水を飽和したブタノール，アミルアルコール，95%エタノール，95%メタノール，メタノールー水（6：10)，アセトンー水（4：10）などでは沪紙の中程から原点にかけ細長くテーリングしいずれも目的を達し得なかつた．

2. 沪紙の処理および展開液

Datta, Overell[9)]はビタミンに，Bush[10)11)]はステロイド系ホルモンの分離にアルミナ処理をほどこした沪紙を用いて好結果を得た．

大麻エキスの場合東洋沪紙No. 50をそのまま使用した結果，不満足に終つたので沪紙に次の処理を試み展開した．

a）沪紙処理の方法

東洋沪紙No. 50（2.5×40cm）を60～65°に加温した30%硫酸アルミニウム溶液に3分間浸した後，アンモニア蒸気を充満した密閉容器中に入れ1時間放置する．処理した沪紙は流水中で6時間洗い常温乾燥後直ちに試料をつけ展開した．硫酸アルミニウム溶液の沪紙への浸透不均一，水洗不充分はスポットのテーリング，Rf値の変動の原因となる．又処理後の沪紙はすみやかに使用しないと活性を失う．

b）展開液

次のような展開液について実施した．

ブタノール－酢酸－水（5：1：4）　スポット0.8附近でテーリング

ブタノール－1%アンモニア水（20：1）　沪紙の中程から原点までテーリング

アミルアルコール－1%アンモニア水（20：1）　沪紙の中程から原点までテーリング

ブタノール－ベンゼン－水（5：1：4）　展開液の上端附近まで上昇

95%メタノール　　Rf＝0.61

95%エタノール　　Rf＝0.85

水飽和ブタノール

　上端附近にややまとまつたスポットを示す．Rf＝0.95

水飽和アミルアルコール

　上端附近にややまとまつたスポットを示す．Rf＝0.87

これらの結果では95%メタノールがもつともすぐれスポットもまとまり，テーリングもわずかで95%エタノールがこれに次ぎ他は未処理の沪紙と大差なかつた．

3. 発色試薬

Jacob, Todd[2] が cannabinol, cannabidiol は2・6ジブロムキノン 4-クロルイミドで呈色することを報告しているがこれを展開沪紙の発色試液に応用して鋭敏かつ，明確にスポットを知ることができた．すなわち展開沪紙に5%酢酸ナトリウム溶液を次に2・6ジブロムキノン 4-クロルイミドのアルコール飽和溶液（ギブス試液）を噴霧する．この外リグロインのヨウ素飽和溶液でも検出可能であり，又パラジメチルアミノベンツアルデヒドの3%アルコール溶液100ccに10%塩酸2ccを加えたものを噴霧した沪紙を60°に加温するのもよい．

日本産大麻エキスはギブス試液で青色，ヨウ素飽和リグロイン液で黄褐色，パラジメチルアミノベンツアルデヒド溶液で黄緑色に発色する．

4. 実験結果

大麻エキス試料1，2，3，4， cannabidiolの結晶，およびpyrahexylをアルミナ処理をほどこした沪紙につけ，95%メタノールを用いて25cm展開した．

試料1，2，3，cannabidiol，pyrahexyl はアセトンに溶解して沪紙に附着したが，試料4はアセトンに溶けないのでメタノールに溶解した．沪紙を風乾後5%酢酸ナトリウム溶液と2・6ジブロムキノン 4-クロルイミドのアルコール飽和溶液で発色させたものは表に示すとおりである．

Table 1.　Rf Value and Coloration

	Rf value	limit of identification	color of spot
material No. 1	0.62		blue
2	0.62	600γ	blue
3	0.61	50	blue
4	0.63	50	blue
cannabidiol	0.71	50	purple
pyrahexyl	0.58	30	bluish violet

5. 考　　察

大麻エキス試料No. 1，2，3，4 の沪紙上のスポットはいずれも一つで，Rf値，呈色からみて同一物であると推定される．大麻エキス試料および pyrahexyl は沪紙上でアルコール性水酸化カリウム液により発色しないが cannabidiol は紫色に発色する．このことやRf値の相違から，大麻エキス試料中のスポットはcannabidiol 以外のものであると思われる．又，炭末吸着部である No. 3，4 が含量多く，不吸着部であるNo. 2 は含量が少くなつている．

むすび　日本産大麻の抽出エキスについて沪紙クロマトグラフィーを試みたが無処理の沪紙では不満足な結果に終つたので硫酸アルミニウムとアンモニア蒸気とで処理した沪紙を使用した．

展開液は95%メタノール，発色試液は5%酢酸ナトリウム溶液と 2・6 ジブロムキノン 4-クロルイミドのアルコール飽和溶液がもつとも良好であつた．大麻エキス試料のスポットはいずれも一つであり，同時に展開した cannabidiol および pyrahexyl のスポットからみて cannabidiol 以外のものと推定される．

なお大麻抽出を引受けられた武田薬品工業東京工場，西沢，中山，兼子，石川の諸氏に謝意を表する．
本研究の費用の一部は厚生科学研究補助金をもつてあてた．

文　　献

1) Duquénois, M. P. : *Annales de médecine légale et de criminologie* 34, 224 (1954).
2) Adams, R., Hunt, M., and Clark, J. H. : *J. Am. Chem. Soc.*, 62, 196 (1940).
3) Jacob, A., and Todd, A. R : *J. Chem. Soc.*, 649 (1940).
4) Ghosh, R., Todd, A. R. : and Wilkinson, S. : *J. Chem. Soc.*, 1121 (1940).
5) 中林敏郎，西田真一郎：農化，26，333 (1952).
6) 大島康義，中林敏郎，西田真一郎：農化，26，367 (1952).
7) 中林敏郎：農化，27，813 (1953).
8) Durant, J. A. : *Nature*, 169, 1062 (1952).
9) Datta, S. P., and Overell, B. G. : *Biochem. J.*, 44, xliii (1949).
10) Bush, I. E. : *Nature*, 166, 445 (1950).
11) Bush, I. E. : *Biochem. J.*, 50, 370 (1952).

Summary

In 1954, Duquénois reported his microchromatographic study on the identification of hashish and hemp using Beam's reagent as color developing reagent and ammoniacal acetone as solvent.

Beam's reaction is the most famous for the identification of hemp and is characteristic of cannabi diol which is physiologically inactive. This component is absent from the Japanese hemp extract that we tested and no spot could be detected by Beam's reagent on filter paper in the chromatography of Japanese hemp extract, so we used Gibbs' reagent as the developing reagent.

In our experiment, ammoniacal acetone which Duquénois used gave a spot nearly at the top of solvent and so was not very suitable. Many solvents were tried experimentally to find a suitable developing solvent, but they were all unsatisfactory in terms of shape of the spot, Rf value, and trailing, on an ordinary filter paper.

Then we used an alumina-impregnated filter paper. Of the solvents tried on this paper, 95% methanol gave fairly good results.

The Rf values and colorations thus far obtained by this procedure using Gibbs' reagent were given. Rf value, hemp extract 0.61–0.63, cannabidiol 0.71, pyrahexyl 0.58; coloration of the spot by Gibbs' reagent, hemp extract, blue; cannabidiol, purple; pyrahexyl, bluish violet. Pyrahexyl is a synthetic analog of tetrahydrocannabinol.

The spot of cannabidiol can be also developed by Beam's reagent. But the spot of the hemp extract was not shown by this reagent.

From this result and the Rf value, it is concluded that the spot of Japanese hemp detected by Gibbs' reagent on filter paper is produced by some other compound than cannabidiol.

Received June 18, 1957

沪紙クロマトグラフィーによるあへん中のモルヒネ定量について（その2）

朝比奈晴世，大野昌子

Quantitative Determination of Morphine in Opium by Paper Chromatography. II.

Haruyo ASAHINA and Masako ŌNO

まえがき　われわれは前報[1]において，少量のあへん中のモルヒネを定量するために沪紙クロマトグラフィーによる方法をとりあげ，まずあへんチンキ中のモルヒネを定量し，満足な結果を得たことを報告したが，更にこれをあへん中のモルヒネの定量に応用し，各国産あへんについて現行公定書法である日本薬局方によるモルヒネ定量値と比較してみた．前報では，展開後スポットを切取り，ベンゼンに浸して測定する方法もあわせて報告したが，今回はそのまま直接測定して充分目的を果すことができた．

実験の部

I　あへんよりのモルヒネ抽出

風乾したあへん約0.1gを精密に秤り，共栓遠心沈澱管に入れ，正確にN/10塩酸1ccを加えてガラス棒で均一になるまでかきまぜ，1時間放置したのち5分間遠心分離する．上澄液0.003ccを精密にミクロピペットでとり試料とする．この場合モルヒネ以外のあへんアルカロイドも抽出されるが，これらは沪紙クロマトグラフィーによりモルヒネから完全に分離される．

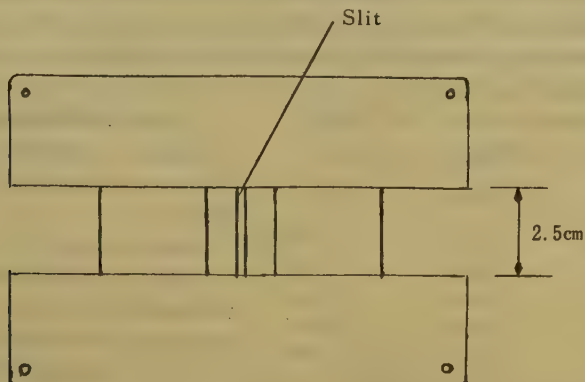
II　あへんの沪紙クロマトグラフィー

沪　紙　：　東洋沪紙 No. 51,　2.5×40cm
容　器　：　東洋沪紙クロマト管C号
展開液　：　n－ブタノール：アンモニア（28%）：水＝50：9：15　の上層
展開法　：　上昇法で約25cm展開する

上記の条件で沪紙クロマトグラフィーを行うが，検量線を作成するため同容器内，同一条件であへんチンキ(モルヒネ含量1%) 0.001cc及び0.006cc（モルヒネ含量10γ，60γに相当）を対照として同時に展開する．

III　Beckman分光々度計による吸光度測定

われわれは沪紙移動装置として，第1図のような簡単な装置を作つて使用した．

Fig. 1.　Apparatus for Passing the Filter Paper

Front view (Scale 1/2)

Beckman DU型分光々度計の試料箱をはずし，自製の装置を螢光分析用試料箱に付して第2図のようにとりつける．Aの部分は沪紙の巾に等しくあいているから，展開後の沪紙を，第3図のようにセルロイド板にセロテープで接続させ，引張りながらここを通過させて測定した．

Fig. 2. Apparatus of Our Making, Attached Tightly to the Beckman Spectrophotometer

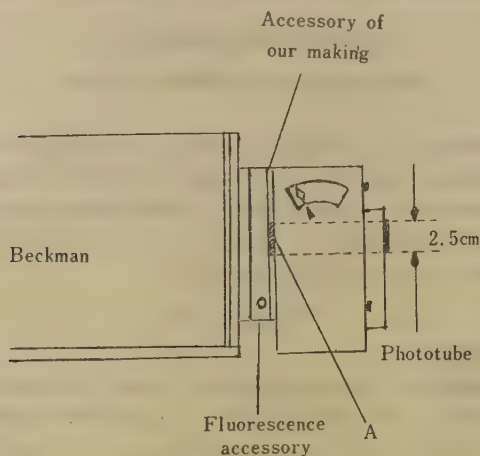
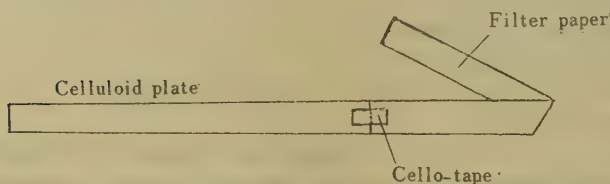



Fig. 3. Filter Paper Fastened to Celluloid Plate with Cello-Tape

この場合，沪紙上でそのまま吸光度を測定することができる．すなわち沪紙を移動させながら，スポット以外の吸収の均一になつた部分を0とし，スポットの最大吸収部の吸光度を測定する．

Ⅳ あへん中のモルヒネ含量算出

あへんチンキ中のモルヒネが，10～60γの範囲で直線関係を有することは，前報[1]に報告したとおりである．そこで対照として展開した10γ及び60γのモルヒネを含有するあへんチンキのモルヒネのスポットの，286mμにおける最大吸収部の吸光度を測定して検量線を描き，同様にして測定して得た試料中のモルヒネの吸光度から，簡単にモルヒネ量を算出する．

Table 1. Morphine Results by Two Methods

Sample	Morphine Content	
	our method	J.P. Ⅳ
China	9.5%	8.43 %
Illicit origin 1	13.3	10.80
Illicit origin 2	14.7	13.47
Turkey Export	13.5	13.61
India Excise	11.6	9.98
Iran Fars	12.8	11.22

Ⅴ モルヒネ定量値の比較

われわれは，産地を異にする数種のあへんについて，本法及び日本薬局方Ⅵによるモルヒネ定量値を比較した．

この表で明かなように，モルヒネ定量値は，ほとんど本法によつた場合の方が高い．これは局方の方法が沈澱法であり，かつモルヒネ溶解度に対する補正値を含んでいないために，多くの場合，特にコデインとモルヒネの含量比が大きいあへんでは低い定量値を示す[2]のに反し，本法が抽出法であるためで

はないかと思われる．

むすび　沪紙クロマトグラフィーにより，沪紙上に展開したモルヒネを，そのまま沪紙上で吸光度を測定し，簡単にあへん中のモルヒネを定量することができた．

なお，この方法により，昭和30年春日部試験場で栽培されたけし「一貫種」の，果実個別のあへん 82例，***Papaver seligerum*** **DC.** よりのあへん，及び春日部試験場，日本新薬株式会社で栽培された採汁回数別のあへんについて分析したモルヒネ定量値は，Bulletin on Narcotics Vol.8, No.4, 39−44 (1956) に発表したことを附記する．

吸光度測定及び測定装置に関し，多大の御援助を賜つた当所太幡技官に感謝する．

文　　献

1) 朝比奈晴世，大野昌子：衛試，73，59−62 (1955).
2) 朝比奈晴世：衛試，72，55−57 (1954).

Summary

In a previous paper, we gave our first account of our method for the quantitative determination of morphine by paper chromatography and spectrophotometry. It was applied to checking the percentage of morphine in opium tincture.

The present paper describes the extention of this method to morphine in raw opium and this can be done even when the amount of opium is very small.

The method is based upon the direct measurement of the absorbance on the filter paper by the Beckman DU spectrophotometer.

Morphine is extracted with hydrochloric acid and the hydrochloric acid solution is chromatographied using a top layer of the mixture ; n-butanol 50, 28% ammonia 9, distilled water 15 as developing solvent.

Chromatography of an opium tincture made to contain 1% morphine is carried out simultaneously in the same container, in order to obtain a calibration curve.

The maximum absorbances of the morphine spots on the paper, Toyo filter paper No.51, of both the opium tincture and the opium extract are determined at 286 mμ, while the absorbance of the other part of the filter paper (where there is no spot) is set at zero.

We use a simple apparatus for passing the filter paper. In place of the sample chamber, an accessory of our making is attached tightly to the Beckman by using the part of the accessory for fluorescence.

From the calibration curve of the opium tincture and the absorbance of the morphine spot of the opium extract thus obtained, the content of morphine in the opium is calculated.

This method gives somewhat higher morphine results than the Japanese Pharmacopoeia VI method in a substantial number of opium samples and especially so on codeine-high opiums, but it should not be forgotten in making such comparisons that the assay of the J.P. VI is a precipitation method which does not employ any added solubility correction. Therefore, our method sounds extremely good in the determination of morphine in raw opium.

Received June 18, 1957

あへん産地鑑別法について（第8報）"Porphyroxine-Meconidine"の比色定量（その3）

朝比奈 晴 世，水 町 彰 吾

Research on the Methods of Determining the Origin of Opium. VIII. The Colorimetric Determination of "Porphyroxine-Meconidine"(3).

Haruyo Asahina and Shōgo Mizumachi

まえがき　あへん中の"porphyroxine-meconidine"（以下p.m.と略す）の含量は，あへんの産地によつて異なつており，これの測定は産地鑑別の有力なる手段である[1-7]．けしの乳液の採取回数が増加するにつれてあへん中のモルヒネの含量は明らかに減少するのであるが[8]，p.m.が減少を示すか否かは興味ある問題であるので，採汁回数別にp.m.を測定してみた．

日本産あへんのp.m.の含量が多いことはわれわれの測定で判明しているが[9,10]，今回は昭和30年度産あへんについて測定した．更に国際連合より贈与をうけたあへん標本についても測定したのでその値を附記する．

実 験 材 料

No. 1：当所和歌山薬用植物栽培試験場で昭和29年度に試験栽培したけしより切取法で採取した採汁回数別あへん．

No. 2：前記けしからの追いがき法による採汁回数別あへん．

No. 3：日本新薬株式会社山科薬用植物研究所で昭和29年度に試験栽培したパキスタン産の種子より栽培した白花のけしより採取した採汁回数別あへん．

No. 4：前記研究所の紫花のけしより採取した採汁回数別あへん．

No. 5：国際連合より贈与されたインド産（U.N. No.180，181）あへん．

No. 6：昭和30年度和歌山県産あへん．

No. 7：同　　大阪府産あへん．

No. 8：同　　愛知県産あへん．

No. 9：同　　長野県産あへん．

No.10：同　　広島県産あへん．

No.11～No.30：国際連合よりの寄贈あへん．

実験方法　前報[9,10]と同じ．

実験結果　次の表のとおりである（表中 I，II，III，IVは採汁回数の順位を示す）

Table 1. "Porphyroxine-Meconidine" Value

No.	P.M. Value	No.	P.M. Value	No.	P.M. Value
1-I	1.524	3-I	2.129	6	3.377
1-II	1.915	3-II	2.267	7	2.674
1-III	2.487	3-III	2.145	8	0.971
1-IV	2.228	3-IV	2.973	9	1.583
2-I	2.175	4-I	1.157	10	0.820
2-II	3.167	4-II	0.380	11	0.510
2-III	2.407	5-I	0.755	12	0.139
2-IV	2.376	5-II	1.115	13	1.034

No.	P. M. Value	No.	P. M. Value	No.	P. M. Value
14	0.327	20	0.136	26	0.691
15	0.438	21	0.225	27	0.381
16	0.914	22	0.305	28	1.975
17	0.217	23	0.162	29	0.384
18	0.261	24	0.717	30	1.391
19	0.915	25	1.234		

P.M. Valueは実際に測定してえた吸光度をあへん0.1gよりの酢酸10cc溶液の値に換算して比較した．

考　察　日本産白花けし「一貫種」より採取したあへんではp.m.は，採汁回数によりほとんど変動しない．前報[9,10]にも述べたとおり日本産あへんのp.m.が著しく多量であることを更に確認した．

むすび　昭和29年度に試験栽培したけしよりのあへんについて比色法でp.m.を測定した結果採汁回数別にかかわりなくその含量が著しく多く，昭和30年度に収納したあへんについてもその含量が著しく多いことが判明した．

測定について大野技官の援助を得た．

比色定量に関し御援助を賜つた山口部長，伊藤技官，あへん分与に御厚志を示された厚生省麻薬課に感謝する．

文　献

1) United Nations Document, ST/SOA/SER.K/25.
2) United Nations Document, ST/SOA/SER.K/31.
3) United Nations Document, ST/SOA/SER.K/31/Add 1.
4) United Nations Document, ST/SOA/SER.K/36.
5) United Nations Document, ST/SOA/SER.K/41.
6) United Nations Document, ST/SOA/SER.K/47.
7) United Nations Document, E/CN.7/278.
8) Asahina H. and Ōno M.: Bulletin on Narcotics, Vol. 8, No. 4, 39–44 (1956).
9) 朝比奈晴世，水町彰吾：衛試，72，73–75 (1954).
10) 朝比奈晴世，水町彰吾：衛試，73，63–64 (1955).

Summary

The content of "porphyroxine-meconidine" of opium from successive lancings of the same poppy capsules was determined. No considerable variations of the content were recognized in such opiums from the white flowered poppy "Ikkanshu".

The content of "porphyroxine-meconidine" of Japanese opiums produced during 1954–55 was determined and was found extremely high.

Received June 18, 1957

沪紙クロマトグラフィーによるあへん中の主要アルカロイドの定量

朝 比 奈 晴 世，大 野 昌 子

A Unified Analysis of Opium for Main Alkaloids by Paper Chromatography

Haruyo ASAHINA and Masako ŌNO

まえがき あへん中に含まれている主要アルカロイド，すなわちモルヒネ，コデイン，テバイン，パパベリン，ナルコチンを分離定量することは，あへんの性質を知り，その産地との連関性を確かめる上に必要である．[1)2)] 従来[3)4)5)6)]及び現在[7)8)]行われているこれらアルカロイドについての分離定量法は，多量の試料と時間を要し，又その操作が複雑であつて，決して満足すべきものではない．われわれは，さきに沪紙クロマトグラフィーによるあへん中のモルヒネ定量法について報告したが，[9)10)] この方法をコデイン，テバイン，パパベリン，ナルコチンに応用し，系統的にこれらあへんの主要アルカロイドを定量した．この方法は少量のあへんに適用でき，又短時間で定量できる利点がある．

実 験 の 部

I 沪紙クロマトグラフィー

1) 沪紙クロマトグラフィーの条件

(i) 沪紙：東洋沪紙No. 51，2.5×40cm

(ii) 容器：東洋沪紙クロマト管C号

(iii) 展開液：

(a) モルヒネ，コデインの場合

n-ブタノール：アンモニア（28%）：水＝50：9：15の上層

(b) テバイン，パパベリンの場合

氷酢酸 4 cc に n-ブタノールを加えて 100cc とし，更に水を飽和させた液

(c) ナルコチンの場合

n-ブタノール：氷酢酸：水＝5：1：4の上層

(iv) 展開法：上昇法で約23～25cm 展開

2) Rf 値

前記展開液による各アルカロイドの Rf 値はそれぞれ次のとおりであつた．

	Rf 値
モルヒネ	0.72
コデイン	0.83～0.85
テバイン	0.50～0.54
パパベリン	0.68～0.70
ナルコチン	0.69

II 沪紙上アルカロイドの吸収スペクトル測定

i) 沪紙上におけるアルカロイドの吸収極大波長の測定

さきに報告した方法[11)]に従い，沪紙上に展開したアルカロイドのスポットを切取り，セルに入れ，スペーサーで押えて吸収スペクトルを測定した．

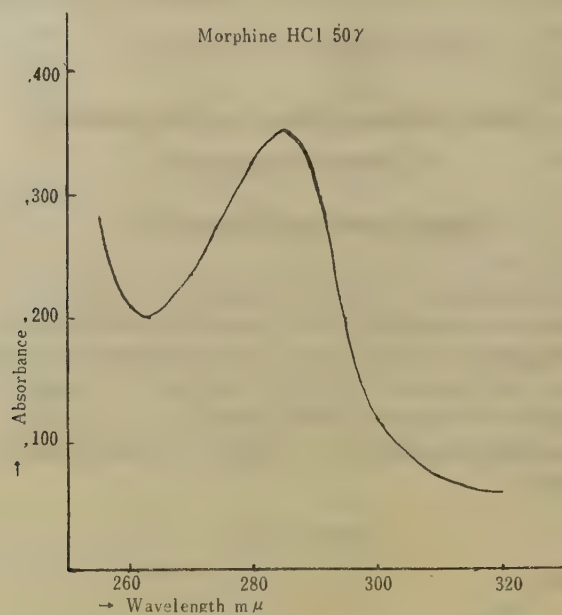



Fig. 1. Ultraviolet Absorption Spectrum of Morphine

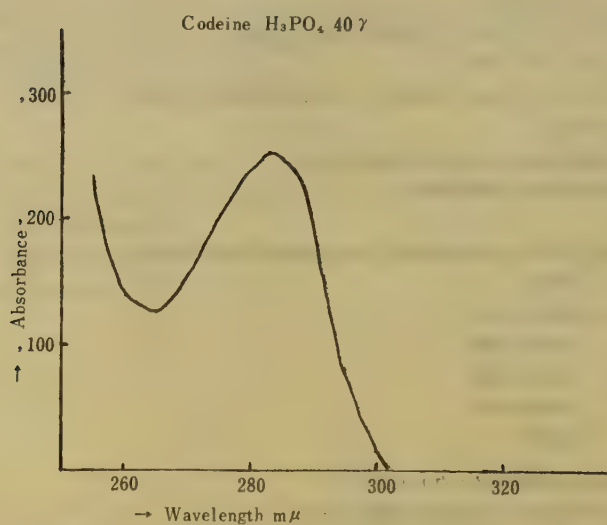



Fig. 2. Ultraviolet Absorption Spectrum of Codeine

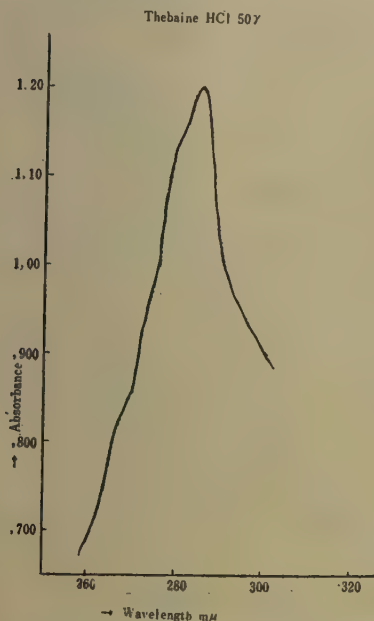



Fig. 3. Ultraviolet Absorption Spectrum of Thebaine

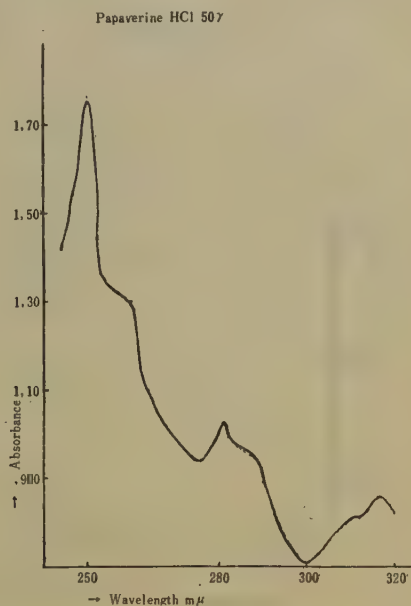



Fig. 4. Ultraviolet Absorption Spectrum of Papaverine

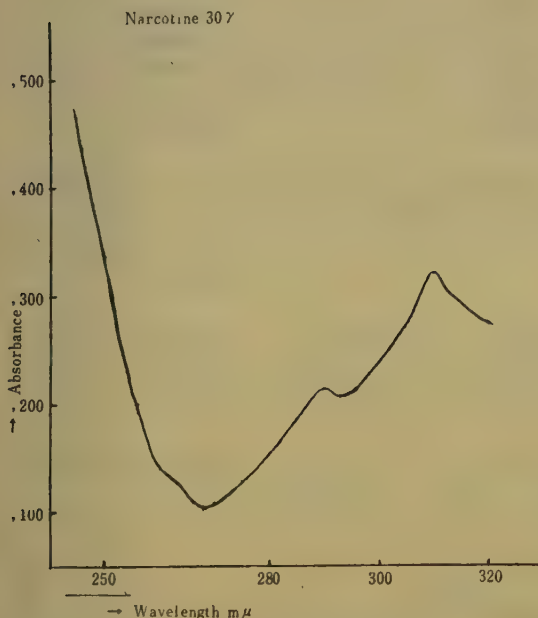



Fig. 5. Ultraviolet Absorption Spectrum of Narcotine

第1図～第5図は，前記の方法により測定した主要あへんアルカロイドの紫外部吸収スペクトルであるが，これによると各アルカロイドの吸収極大波長 λmax は次のとおりであつて，溶液の場合の値[12] と大体一致する．

	λmax
モルヒネ	286 mμ
コデイン	283
テバイン	285
パパベリン	281
ナルコチン	290

ii) 特定波長における最大吸収部の吸光度と濃度との関係

モルヒネが 10～60γにおいて，濃度とスポットの λmaxにおける最大吸収部の吸光度との間に直線性を有することはすでに報告したが，[9] コデイン，テバイン，パパベリン，ナルコチンについて，さきに報告した方法[11),13] で検討したところ，コデインでは 5～30γ，塩酸テバイン，ナルコチンにおいてはそれぞれ 10～60γ，塩酸パパベリンでは 5～40γ において直線性を有していた．

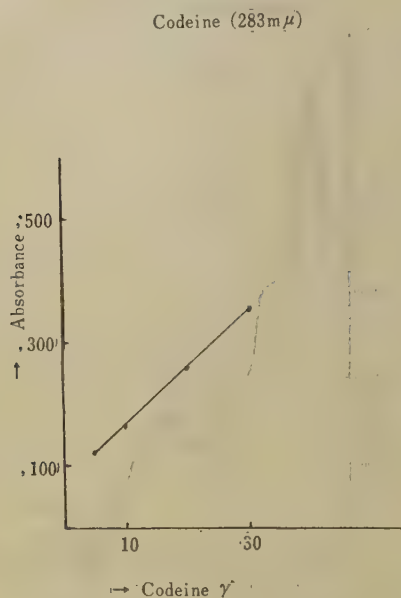



Fig. 6. Calibration Curve of Codeine

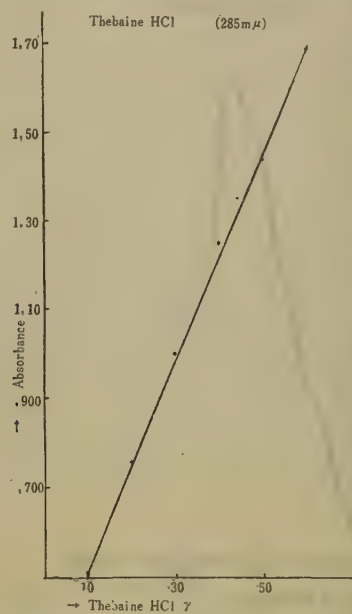



Fig. 7. Calibration Curve of Thebaine Hydrochloride

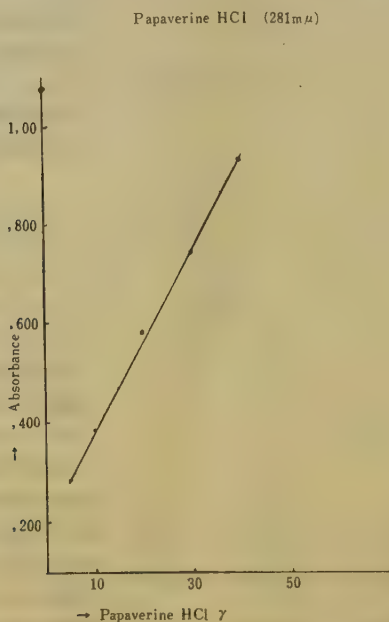



Fig. 8. Calibration Curve of Papaverine Hydrochloride

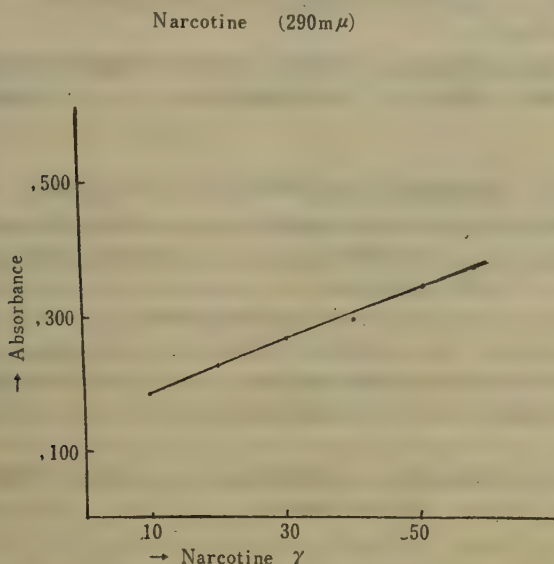



Fig. 9. Calibration Curve of Narcotine

なお濃度と，λmax における沪紙上スポットの最大吸収部の吸光度は次のとおりであつた．

Amount γ / Alkaloid	5	10	20	30	40	50	60
Codeine	0.121	0.164	0.260	0.353	—	—	—
Thebaine Hydrochloride	—	0.510	0.760	1.000	1.250	1.440	1.690
Papaverine Hydrochloride	0.280	0.389	0.584	0.749	0.938	[illegible]	—
Narcotine	[illegible]	0.185	0.231	0.273	0.305	0.360	0.401

以上の結果から同一容器内，同条件で対照を用い，同時に沪紙クロマトグラフィーを行い検量線を作成すれば，これからあへん中のこれらアルカロイドを容易に定量することができる．

Ⅲ　あへんの定量

1)　アルカロイドの分離法

(i)　モルヒネ

あへん約0.1gを精密に秤り，共栓遠心沈澱管中でこれにN/10塩酸1ccを正確に加え，ガラス棒で均一になるまでかきまぜ，1時間放置したのち5分間遠心分離する．上澄液0.003ccを正確にミクロピペットでとり，沪紙クロマトグラフィーの試料とする．試料0.003ccはモルヒネ含量10%として，その30γに相当する．

(ii)　コデイン

前記上澄液0.5ccを正確にとり，分液漏斗中でクロロホルムそれぞれ2ccずつ2回，1ccずつ3回を用いてテバイン，パパベリン，ナルコチン等を抽出する．この場合コデインは抽出されないから，水層0.005ccをミクロピペットで正確にとり，沪紙クロマトグラフィーの試料とする．試料0.005ccはコデイン含量2%として，その10γに相当する．

(iii)　テバイン及びパパベリンとナルコチンとの分離

(ii)のクロロホルム抽出液を合し水浴上で蒸発する．残留物をベンゼン3ccに溶かし，これにアルコール製10%水酸化カリウム液を加え，室温で40分間放置したのちベンゼン3ccずつ3回，N水酸化ナトリウム液6cc1回を用い小分液漏斗中に移してふる．水層を分ち，ベンゼン層（テバイン，パパベリンを含む）をN水酸化ナ

トリウム液3ccずつ2回，ついで水3ccずつ2回を用いて洗い，洗液は水層に合する．

(iv) テバイン及びパパベリン

(iii) のベンゼン液を沪過し，沪液を水浴上で蒸発する．残留物をN/10塩酸0.3ccに正確に溶かし，この0.006ccをミクロピペットで正確にとり試料とする．試料0.006ccはテバイン，パパベリン含量それぞれ1%として，その10γに相当する．

(v) ナルコチン

(iii) の水溶液を沪過し，沪液に濃塩酸3ccを加え，95°の水浴中で30分間加熱する．冷後クロロホルムそれぞれ10，10，5及び5ccずつを用いてナルコチンを抽出する．クロロホルム液を合して水浴上で蒸発し，残留物を正確にN/10塩酸0.3ccに溶かし，その0.003ccをミクロピペットで正確にとり試料とする．試料0.003ccはナルコチン含量3%として，その15γに相当する．

この様にして分離したあへんアルカロイドにつき，前記の条件で沪紙クロマトグラフィーを行うが，得られるスポットの最大吸収部の吸光度は，温度，展開液の組成の変動などによつて異なるから，対照は毎回同時に展開する．検量線を作成するためにはモルヒネの場合では10，60γ，コデインでは10，30γ，塩酸テバイン，ナルコチンではそれぞれ10，50γ，塩酸パパベリンでは5，30γを用いる．

Ⅳ **定量値の比較**

国連寄贈あへんについてこの分析法を試み，日本薬局方によるモルヒネ定量値,[14] Anneler変法による副アルカロイド定量値[15] と比較したところ，次のとおりであつた．

本法による定量値

Sample	Morphine	Codeine	Thebaine	Papaverine	Narcotine
Turkey Export U.N.15	13.5%	1.7%	0.8%	0.8%	4.9%
India Excise U.N.36	11.6	4.2	1.8	0.4	6.3
Iran Fars U.N.47	12.8	4.0	3.5	1.5	7.1

日本薬局方，Anneler変法による定量値

Sample	Morphine	Codeine	Thebaine	Papaverine	Narcotine
Turkey Export U.N.15	13.61%	1.03%	1.10%	0.94%	4.31%
India Excise U.N.36	9.98	3.04	1.82	0.57	6.57
Iran Fars U.N.47	11.22	3.91	3.67	1.53	7.44

これら二表で明らかなとおり，両方法による定量値は，ほぼ類似した値を示している．

むすび 本定量法は少量のあへんについても応用でき，主要あへんアルカロイド全部が簡単に，僅か1日半で定量できるので非常に便利である．

文献

1) *Bulletin on Narcotics*, Vol. 1, No. 1, 14 (1949).
2) United Nations, Economic and Social Council, E/CN.7/278, 1954.
3) 町口英三：薬誌，529，185−228 (1926)；衛試，30，1−48 (1927)．
4) Klyachkina B. A.: *Arch. d. Pharm.*, 1933, 558−568.
5) Anneler E.: Festschrift Herrn Emil Christoph Barell, 344−362 (1936).
6) 有馬純三，岩切三雄：大陸科学院報告，2，221−230 (1938)．
7) 梁基奎，程樹棨：台湾薬誌，4，2−10 (1952)．
8) United Nations Secretariat ST/SOA/SER.K/34 (1954).
9) 朝比奈晴世，大野昌子：衛試，73，59−62 (1955)．
10) 朝比奈晴世，大野昌子：衛試，75，49−51，(1957)．
11) 朝比奈晴世，大野昌子：衛試，74，61−64 (1956)．

12) Oestreicher P. M., Farmilo C. G., Levi L. : *Bulletin on Narcotics*, Vol. 6, No. 3/4, 42−70 (1954).

13) Asahina H., Ōno M. : *Bulletin on Narcotics*, Vol. 8, No. 4, 39−44 (1956).

14) 朝比奈晴世，水町彰吾：衛試，71，20−25 (1953).

15) 朝比奈晴世：衛試，72，63−71 (1954).

Summary

Our paper chromatographic method for the quantitative determination of morphine in opium has been extended to the other most important secondary alkaloids : codeine, thebaine, papaverine and narcotine and thus a new systematic analysis of opium has been worked out.

The paper chromatography alone does not provide sufficient separation of these alkaloids and some simple chemical separations are used.

Opium is extracted with hydrochloric acid and the hydrochloric acid solution is used for the determination of morphine. Then the acidic solution is extracted with chloroform to remove thebaine, papaverine and narcotine which have similar Rf values and may interfere with the codeine measurement. After the extraction, the acidic solution is spotted for the codeine determination and the chloroform extract is reserved for thebaine, papaverine and narcotine.

The separation of narcotine from thebaine-papaverine mixture is accomplished with alcoholic potassium hydroxide by opening the lactone ring in narcotine. In this process, thebaine and papaverine remain unaffected and then are shaken out with benzene. Thebaine and papaverine are separated from each other by paper chromatography and determined on the same filter paper. Narcotine is regenerated by heating with hydrochloric acid and extracted from acidic solution with chloroform, obtained as a chromatographic spot, and determined like other alkaloids.

For each of the alkaloids, a spot is obtained on filter paper by chromatography with the following appropriate solvent : for morphine or codeine, the top layer of a mixture of n-butanol, 28% ammonia, and water, 50 : 9 : 15, parts by volume; for thebaine and papaverine, the solvent made from n-butanol and glacial acetic acid, and then saturated with water; for narcotine, the top layer of a mixture of n-butanol, glacial acetic acid, and water, 5 : 1 : 4, parts by volume.

The wavelength at which the absorption of the alkaloidal spot was a maximum, was determined on the filter paper by the Beckman DU spectrophotometer. When pure alkaloid was used, we found the maximum absorption for each alkaloid at the following wavelength : morphine 286mμ, codeine 283mμ, thebaine 285mμ, papaverine 281mμ, narcotine 290mμ.

Then the maximum absorbance of the alkaloidal spots was measured directly at the above wave lengths by passing the filter paper through the Beckman. The relationship between the amount of alkaloid and the absorbance showed a straight line over a fairly wide range : morphine, from 10 to 60γ, cod- eine, from 5 to 30γ, thebaine hydrochloride, from 10 to 60γ, papaverine hydrochloride, from 5 to 40γ, narcotine, from 10 to 60γ.

From the maximum absorbance of the spot from the opium solution on the filter paper and the calibration curve, the alkaloid content in the opium is calculated, and the calibration curves are prepared for each series of assay by the standards run simultaneously with the sample.

By this method, the five main alkaloids in opium can be assayed with one weighing in of a small quantity of opium, 0.1g or less, in a shorter time than has been required for any analysis heretofore.

This method gives very similar values to those obtained by us according to J.P. VI method for morphine and a modification of Anneler's method for other alkaloids.

Received June 18, 1957.

けし個体選抜に於ける個体間の生育並にあへん収量の差異について

喜谷市郎右ヱ門，木下孝三，中川雄三
伊阪博，今井雅子，東谷芳江

On the differences of Growth and Opium Yield in the Individual Selection of Opium Poppy. (*Papaver Sommniferum L.*)

Ichirōemon KIDANI, Kozō KINŌSHITA, Yūzō NAKAGAWA,
Hiroshi ISAKA, Masako IMAI and Yoshie TŌTANI

まえがき 和歌山薬用植物栽培試験場における昭和31年度産けしの生育良好なものを開花期に，坊子の形状，大きさ等を観点として90個体を選抜し，採汁期に個体間の生育並びにあへん収量の調査を行つた成績を報告する．

実験の部

試験材料 和歌山薬用植物栽培試験場における昭和31年度産のけし選抜個体90検体．

けし個体選抜耕種梗概

1. **種　子** 昭和30年7月集団採種したものをウスプルン500倍液で3時間浸漬してそのまま，水洗せず乾燥消毒を行つた．
2. **品　種** 一貫種系統
3. **整　地** 播種期は昭和30年11月8日，反当播種量は300gで，播種法は条播播種後覆土は全く行わずに籾殻で被覆した．
4. **管　理**

 1. **間引** 1月中旬，2月中旬，3月上旬の3回，最期の間引のとき株間を5寸の間隔にする．反当10,800仕立．
 2. **中耕** 12月下旬，2月上旬，4月上旬の3回
 3. **除草** 中耕を兼ね必要の都度行う
 4. **病害防除** 8斗式ボルドー合剤，反当，1石5斗の割で撒布する．撒布は3月下旬，4月上旬，4月中旬5月上旬の4回．
 5. **肥　料** Table 1の通り施用した．

Table 1. Fertilizer list (施肥表)

施肥別	肥料名	反当施肥量	同3要素量 N	P	K	施肥期
		貫 匁	貫 匁	貫 匁	貫 匁	
第1回追肥 (1st top dressing)	硫安 Ammonium Sulphate	1.300	0.260			
第2回〃 (2nd 〃)	〃	1.500	0.300			12月下旬
	過燐酸石灰 Superphosphatelime	0.417		0.062		12月下旬
	硫酸加里 Potlassium Sulphate	0.140			0.084	12月下旬
第3回〃 (3rd 〃)	硫安	1.500	0.300	0.084		2月中旬
	過燐酸石灰	0.557				2月中旬
	硫酸加里	0.210			0.126	2月中旬
止肥	硫安	5.000	1.000			

施肥別	肥料名	反当施肥量	同3要素量 N	P	K	施肥期
		貫 匁	貫 匁	貫 匁	貫 匁	
(Last top dressing)	魚粕 fish guanos	4,000	0.386	0.120		4月上旬
	大豆粕 Soyabean guanos	6,000	0.990	0.084	0.120	
	過燐酸石灰	3,000		0.450		
	硫酸加里	2,000				
	堆肥 Compost	200,000	1,400	0.400		
合計	硫安	9,300				
	過燐酸石灰	3,977				
	硫酸加里	2,350				
	魚粕	4,000				
	大豆粕	6,000				
	堆肥	200,000				
堆肥3要素合計			4,036	1,200	2,330	

6. **採　汁** 採汁法は切取法とし5月22日開始，5月29日完了，3条切，隔日4回切とした．

7. **乾　燥** 選抜個体毎にシャーレに採汁したものを採汁完了後シャーレのまま乾燥箱で電熱乾燥 (65°C) を行つた．

8. **選　抜** 生育良好なものを開花期に坊主の形状，大きさ等を主なる観点として90個体を選抜した．

9. **選抜後の調査** 草丈，葉数，蒴果の表面積，蒴果柱頭分岐数，あへん収量，モルヒネ含量及び種子収量等について調査を行つたがその成績は Table 2 の通りである．

モルヒネ定量法 けし各個体のあへん収量は 0.1～0.41g 平均 0.23g であるので Grant[1]，Hamlow[2] 及び松本[3] 等の報告を検討して次の方法によつた．

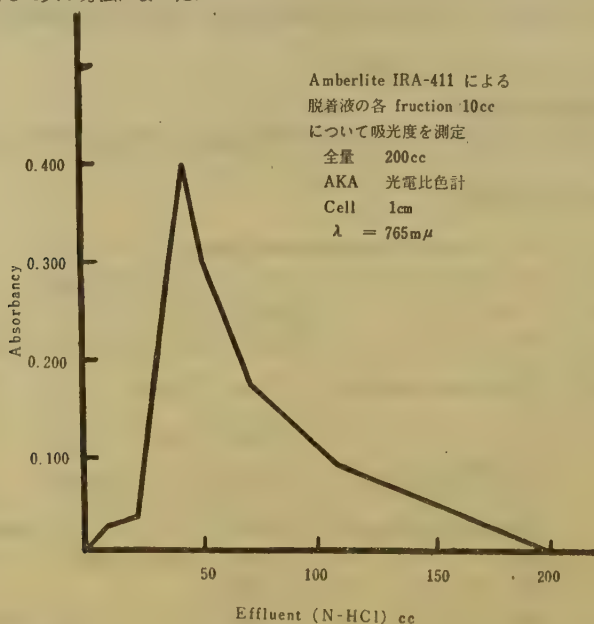



Fig. 1. Elution Curve of Morphine from Amberlite 1RA-411 by N-HCL

あへん0.1～0.2gを精秤し75%メタノール2～3ccを加えて研磨して充分にすりつぶした後，75%メタノール20ccを加えて時々攪拌しながら2時間後遠洗してその上澄液をAmberlite 1 RA－411の5ccを入れたる交換層に1cc/分の速度で通してモルヒネを吸着させる．あへんの残留物は75%メタノール10ccずつで5回浸出してその上澄液を交換層に入れて吸着させたモルヒネをN-塩酸200cc（Fig. 1参照）で完全に脱着後Foline Ciocalteu[4]法によつて発色させて，AKA光電比色計で波長765mμ附近の沪光枚を使用して吸光度を測定し，別に既知濃度のモルヒネ標準液によつて作成した検量線（Fig. 2参照）でモルヒネ定量を行つた．

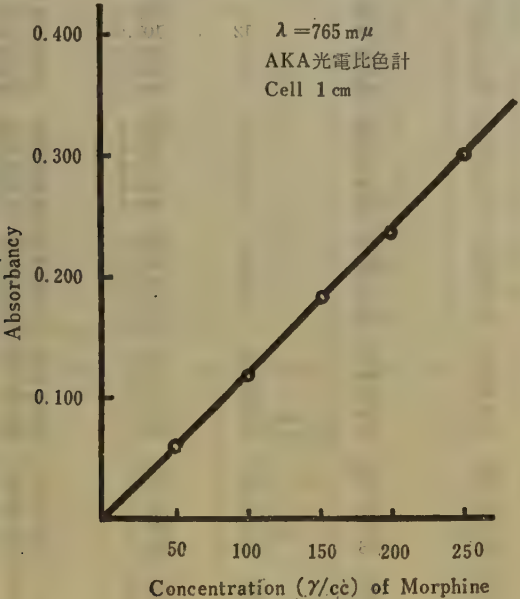



Fig. 2. Calibration Curve

けし個体選抜における個体間の生育並に収量の差異

1. 生育並にあへん収量，モルヒネ含量種子収量の成績 Table 2の通りである．

Table 2. Investigation of growth, Yield of Opium, Morphine content and Yield of Seeds

No. of individual	Length of plant	Number of leaves	Area of surface of capsule	Number of arms of stigma ramosed	Yield of opium	Morphine Content	Yield of morphine	Yield of seeds
	cm		cm		mg	%	mg	g
1	122	16	103	13	190.0	9.55	18.15	0.6
2	119	17	96	12	183.0	13.27	24.28	1.7
3	116	16	111	12	321.2	12.16	39.06	1.1
4	121	19	118	13	344.0	5.98	20.27	2.3
5	119	16	118	10	326.1	12.68	41.34	2.0
6	117	17	111	11	257.0	10.43	26.81	1.2
7	116	16	105	12	191.6	7.6	14.56	3.1
8	114	17	113	13	274.9	11.64	32.00	3.6
9	116	14	111	12	319.6	8.60	27.49	3.6
10	110	16	103	12	179.0	9.08	16.25	4.0
11	103	16	82	13	130.0	9.23	12.00	1.7
12	116	18	103	11	194.1	8.24	15.90	4.4
13	111	16	93	11	255.2	11.61	29.63	3.0
14	100	14	104	12	355.8	12.37	45.29	1.6
15	94	13	113	12	232.7	11.21	26.09	3.1

No. of individual	Length of plant	Number of leaves	Area of surface of capsule	Number of arms of stigma ramosed	Yield of opium	Morphine Content	Yield of morphine	Yield of Seeds
	cm		cm		mg	%	mg	g
16	106	13	106	12	274.4	11.25	30.87	3.0
17	117	14	107	11	199.0	11.52	22.92	4.7
18	120	15	103	12	323.9	12.24	39.65	2.8
19	121	15	102	13	167.8	11.88	19.93	3.8
20	127	15	108	12	231.1	14.05	32.47	3.2
21	124	17	85	10	176.9	12.66	22.40	3.5
22	118	19	86	12	107.0	13.22	14.15	4.2
23	123	16	112	12	119.9	12.76	28.06	3.7
24	121	16	104	11	124.0	11.79	26.39	3.9
25	118	16	87	11	205.3	9.96	20.45	3.1
26	111	15	88	11	172.6	10.16	17.54	3.5
27	104	15	86	11	162.5	11.78	19.14	3.9
28	111	15	79	10	171.0	10.20	17.44	2.6
29	114	15	99	11	129.6	12.16	34.00	1.2
30	103	16	128	12	284.6	9.27	26.38	4.1
31	104	15	109	12	219.5	8.92	19.58	3.1
32	110	16	108	12	237.3	9.68	22.97	2.8
33	110	12	97	10	243.0	11.53	28.02	2.9
34	98	12	89	11	193.0	9.99	19.28	2.6
35	103	16	102	11	231.1	10.74	24.82	3.5
36	104	17	107	12	202.5	10.32	20.90	3.6
37	111	15	90	11	204.7	10.17	20.82	3.7
38	106	15	96	11	178.4	9.65	17.82	3.4
39	96	15	94	11	201.1	10.05	20.21	1.5
40	107	17	95	10	263.1	11.61	30.55	3.9
41	105	17	103	10	329.6	11.74	38.70	2.4
42	103	17	87	12	131.5	11.95	15.71	1.8
43	112	26	99	11	193.4	13.01	25.16	3.6
44	111	16	111	11	332.9	10.20	33.96	4.4
45	113	19	118	13	305.7	13.24	40.47	4.1
46	113	18	99	12	263.9	11.60	30.61	1.1
47	117	17	94	11	261.8	11.55	30.24	2.4
48	112	16	81	11	247.4	8.96	22.17	3.3
49	112	15	87	9	177.1	8.45	14.96	2.6
50	115	14	91	12	259.8	11.78	30.57	3.6
51	108	14	103	11	225.8	11.02	24.88	2.7
52	115	13	99	12	259.8	10.86	28.21	2.5
53	117	15	97	11	246.7	12.01	28.85	2.2
54	112	16	117	12	300.5	12.45	37.41	1.7
55	111	11	135	13	404.8	12.71	51.45	3.6
56	115	11	99	10	188.0	12.76	23.99	3.4
57	119	17	91	11	197.3	10.76	21.23	1.6
58	115	17	115	13	193.5	12.39	23.97	2.6
59	116	17	151	13	142.5	10.81	47.83	5.1
60	112	16	128	12	263.0	11.50	30.25	2.9
61	122	14	110	12	245.0	11.90	29.23	3.6
62	119	16	98	12	194.7	12.29	23.93	3.2
63	116	14	123	13	213.7	11.74	25.09	2.6
64	113	13	121	12	268.0	11.82	31.68	4.1
65	112	15	107	12	218.0	12.36	26.94	3.4
66	112	15	118	11	273.5	12.80	35.00	4.4
67	115	15	110	13	92.5	13.37	12.37	2.9
68	118	15	104	11	186.3	10.29	19.17	3.9
69	122	16	92	11	181.6	11.50	20.88	1.4
70	118	15	85	11	152.8	12.18	18.61	3.8
71	111	16	97	11	211.1	11.87	25.06	3.8
72	115	16	101	12	206.7	12.69	26.23	3.5
73	116	15	116	13	122.5	14.05	17.21	4.5

No. of individual	Length of Plant	Number of leaves	Area of surface of capsule	Number of arms of stigma ramosed	Yield of opium	Morphine Content	Yield of morphine	Yield of Seeds
	cm		cm		mg	%	mg	g
74	112	15	105	12	197.5	11.26	23.53	3.3
75	115	14	97	12	203.2	11.58	37.37	3.4
76	111	14	130	12	334.6	11.17	22.24	4.0
77	103	14	92	11	222.5	10.76	23.94	2.7
78	118	17	101	10	225.0	11.12	25.02	2.9
79	114	15	104	11	212.3	13.08	34.31	4.0
80	112	16	103	12	263.5	11.17	29.43	3.7
81	106	14	105	13	271.5	10.72	29.10	3.0
82	114	14	115	11	318.0	10.63	33.80	2.4
83	113	14	109	11	211.2	11.66	24.68	3.4
84	116	15	105	12	113.5	12.72	16.98	4.3
85	116	17	94	12	304.2	11.79	35.87	1.1
86	117	15	84	10	130.6	12.18	15.91	3.4
87	120	16	115	12	302.7	12.50	37.84	3.3
88	117	18	85	9	193.2	10.92	21.10	2.4
89	121	16	120	13	203.6	12.48	25.41	1.7
90	111	18	82	9	188.8	12.34	23.30	1.4

2. 測定値に対する標準偏差 Table 3 の通りである．

Table 3. Standard deviation of each item

clause	range of dispersion	mean	standard deviation
length of plant	94…127	112.98	6.580
number of leeves	12…26	15.73	1.845
area of surface of capsule	79…151	103.07	6.547
number of arms of stigma ramosed	9…13	11.52	0.985
Yield of opium	92.5…442.5	227.88	6.547
Morphine content	5.98…14.05	11.31	1.520
Yield of Morphine	12.0…51.45	27.31	8.093
Yield of seeds	0.6…5.1	3.01	1.556

3. 各調査項目間の相関係数 Table 4 に示す．

Table 4. Correlation coefficient between each items

Clause		r=	t(n-2)=	P=
Yield of opium	; length of plant	-0.0217	0.203	$0.8<p<0.9$
	number of leaves	-0.0375	0.352	$0.7<p<0.8$
	area of surface of capsule	0.6389	7.791	$p<0.001$ significant
	number of arms fo stigma ramosed	0.1610	1.530	$0.1<p<0.2$
	morphine cont.	-0.0748	0.703	$0.4<p<0.5$
	Yield of morphine	0.7327	10.099	$p<0.001$ significant
	Yield of seeds.	0.0453	0.425	$0.1<p<0.7$
Morphin cont.	; length of plant	0.2627	2.605	$0.01<p<0.02$ significant
	number of leaves	0.1086	1.024	$0.3<p<0.4$
	area of surface of capsule	0.0758	0.713	$0.4<p<0.5$
	number of arms of stigma ramosed	0.1190	1.124	$0.2<p<0.3$
	Yielp of morphine	0.3338	3.321	$0.001<p<0.01$ significant
	Yield of seeds	0.0554	0.520	$0.06<p<0.7$

Clause		r=	t(n-2)=	p=
Yield of morphine	; length of plant	0.0627	0.589	$0.5<p<0.6$
	number of leaves	0.0028	0.026	$0.9<p$
	area of surface of capsule	0.4652	4.929	$p<0.001$ significant
	number of arms of stigma ramosed	0.1995	1.909	$0.05<p<0.1$
	yield of seeds	-0.0299	0.280	$0.7<p<0.8$
Yield of seeds	; length of plant	0.0456	0.428	$0.6<p<0.7$
	number of leaves	0.0541	0.508	$0.6<p<0.7$
	area of surface	0.2527	2.449	$0.01\vee p<0.02$ significant
	number of arms of stigma ramosed	0.0625	0.587	$0.5<p<0.6$

摘　要　昭和31年度和歌山薬用植物栽培試験場産のけし個体選抜検体90個について調査した成績の摘要は次の通りである.

1. 1個体のあへん収量は最高0.4425g 最低0.092g　$\bar{x}=0.2289$　$\sigma=0.0065$
2. 1顆当りのモルヒネ含量は5.98～14.05%　$\bar{x}=11.31\%$　$\sigma=\pm1.520$
3. 各調査項目の相関係数について有意性を認められるものは次の通りである.
   - i ）あへん収量と蒴果表面積並びにモル生産量.
   - ii ）モルヒネ含量と草丈並びにモルヒネ生産量.
   - iii）モルヒネ生産量と蒴果表面積.
   - iv）種子収量と蒴果表面積.

考　　察

けし個体選抜における個体間の差異は選抜に際してやや観察的，意識的な選抜が加えられているため一般の場合とやや異なると考えられるが，それでも各性状間の遺伝的傾向は充分に察知できると考えられる．収量特にあへん収量の分散度は相当に広く，これは材料とした一貫種と称する品種は系統的に相混交していることを示すものであり，個体選抜による系統分離によりある程度の増収を期待し得る可能性を示している．生育と収量，モルヒネ生産量及び種子収量との間には高度の順相関が認められた．これに次ぐものは柱頭数とモルヒネ生産量あへん収量及びモルヒネ含量との関係である．しかしこの場合はその有意性は認められなかつた．あへん収量とモルヒネ含量との間には逆相関が存在するがその有意性は認められない．このことはあへん収量多く且つモルヒネ含量も高い優良系統を選抜し得る可能性を示すものである.

各個体のあへん収量0.1g程度の少量あへん中のモルヒネ定量にAmberlite 1RA－411を使用してFoline Ciocalteu法で比色定量を行い好結果を得た.

文　　献

1) Grant, E., Hilty, W. : *J. Amer. Pharm. Ass.*, 42, 150 (1953).
2) Hamlow, E., Dehay, H. G., Ramstad, E. : *ibid*, 43, 460 (1954).
3) 松本：厚生科学研究報告医薬品試験法に関する研究（その2）麻薬試験に関する研究（昭和31年3月）.
4) 公衆衛生年報第三巻第二号，犯罪科学試験法註解（昭和31年3月）.

Summary

We have investigated the difference of growth and opium yield on 90 individuals of Opium Poppy selected for the purpose of line separation in Wakayama medical plant experimental station in 1956.

The investigations were chiefly carried out at the period of harvest. Results obtained are summerized as follows.

(1) The yield of opium was maximum 0.4425g. minimum 0.0925g. $\bar{x}=0.228$g. $\sigma=\pm0.0065$g.

(2) The morphine content was maximum 14.05 minimum 5.98. $\bar{x}=11.31$. $\sigma=\pm1.580$.

(3) The significant correlation coefficients are as follows.

1. The yield of opium and the surface area of capsule, the yield of morphine.
2. The morphine content and the length of plant, the yield of morphine.
3. The yield of morphine and the surface area of capsule.
4. The yield of seeds and the surface area of capsule.

Received June 18, 1957.

粉末生薬の純度測定法：分光反射率測定法の応用について

下 村 孟，西 本 和 光，伊 藤 巳 代 子

Purity Determination Method of Powdered Drugs: Application of Reflectancy Determination.

Tsutomu SHIMOMURA, Kazumitu NISHIMOTO, and Miyoko ITO.

まえがき　生薬の粉末はまず，その色によつてある程度分類することができるが，異物を混入した粉末と純粋な粉末とを肉眼的に区別することは困難な場合が多い．市場オウレン末にはしばしばオウバク末を混入して偽和するものがあるが，この場合には肉眼的の判定は不可能である．このようなときにオウレン末中のオウバク末の量を測定する方法はLycopodium法[1]が最も正確であるが，更に分光反射率を測定し表面色の差によつて区別することが可能であるか否かについて検討した．

1．純オウレン末と純オウバク末との測定：

実験方法　デシケータ（塩化カルシウム）で一週間乾燥した純粋のオウレン末及びオウバク末をそれぞれ15種ずつとり，Beckman 分光光度計 B 型を用い 400～630mμ における分光反射率を測定し，それらの反射スペクトルについて30座標撰択法[2]によつて表面色のC光源による3色刺戟値 X, Y, Z を求め，それから3色係数 x，y，z 中 x 及び y を計算によつて求め，それらの定点をC.I.Eの色度図上に表示[2,3]することによつて，それぞれの色の主波長及び純度が求められる．明度は Y 値で直接表わされる．

実験結果　Table 1. 及び Table 2. に示す結果を得た．

Table 1. Colorimetric Values of Surface Color of Powdered Coptis Root.

オウレン末	Y%	主波長mμ	純度%
C_1	28.6	577.9	17.7
C_2	25.4	577.2	62.5
C_3	28.7	576.8	61.7
C_4	27.2	577.6	61.0
C_5	24.1	577.8	59.0
C_6	34.6	575.9	62.0
C_7	30.0	577.5	58.0
C_8	25.6	576.8	58.0
C_9	32.4	575.5	57.0
C_{10}	35.5	577.0	65.5
C_{11}	36.1	577.3	70.0
C_{12}	33.2	578.0	73.0
C_{13}	29.6	577.2	62.5
C_{14}	33.6	577.0	65.9
C_{15}	32.4	578.2	68.2
	24.1～36.1	575.5～578.2	57.0～73.0
標準偏差	6.9	1.35	8.0

Table 2. Colorimetric Values of Surface Color of Powdered Phellodendron Bark.

オウバク末	Y%	主波長mμ	純度%
P_1	42.0	573.7	59.0
P_2	41.3	576.0	57.0
P_3	44.5	576.2	52.0
P_4	42.7	575.8	61.6
P_5	43.5	576.5	52.0
P_6	43.8	575.5	67.0
P_7	43.0	575.5	61.0
P_8	48.6	575.0	61.5
P_9	50.4	574.8	68.5
P_{10}	52.4	574.5	59.0
P_{11}	48.8	574.5	56.0
P_{12}	47.5	574.8	60.5
P_{13}	43.3	575.0	53.6
P_{14}	43.1	577.0	59.0
P_{15}	44.7	575.5	63.0
	41.3～52.4	573.7～577.0	52.0～68.5
標準偏差	5.55	1.65	8.2

考　察　明度（Y）においては数値に巾はあるが，両者は重複せずに完全に分離している．従つて明度から両者を区別することは可能である．主波長においては若干の重なりを示すが，オウレン末は赤の方に傾り，オウバク末はむしろ黄の方に傾つている．純度は両者重複し且つ巾は大である．

2. オウバク末混入のオウレン末の測定：

Table 3のようにオウレン末3種をとり，これに夫々 10, 20, 30, 40, 50% の順にオウバク末を混和した材料をつくり，前項と同様に測定を行う．

実験結果 Table 3 に示す結果を得た．

Table 3. Colorimetric Values of Surface Color of the Various Mixtures of Powdered Coptis and Phellodendron.

オウレン末	オウバク末含有%		Y %	主波長 mμ	純度 %
C_7	P_7	0	30.0	577.5	58.0
		10	29.2	577.4	63.0
		20	31.2	577.3	62.0
		30	32.3	577.0	61.8
		40	33.2	577.0	59.0
		50	34.4	576.7	59.8
C_{10}	P_{10}	0	35.5	577.0	65.5
		10	37.5	576.3	62.5
		20	37.3	576.5	64.0
		30	38.4	576.8	64.0
		40	39.1	576.0	62.2
		50	41.0	575.5	61.6
C_{11}	P_{11}	0	36.1	577.3	70.0
		10	37.3	577.2	69.8
		20	38.3	576.7	67.5
		30	39.9	576.7	65.7
		40	41.5	576.4	64.0
		50	42.4	576.0	63.2

考 察 明度はオウバク末混入の%が大となるに従つて大となる．即ち純オウレン末とは明度において明らかな差を生ずるが，この数値からオウバク末混入の%を推定することは困難である．唯オウレン末の純度が悪いということを推定し得るに止まる．

終りに御指導を頂いた刈米所長，山口部長に深謝する．

文 献

1) 下村：第10回日本薬学大会，シンポジウム生薬部会講演．

2) A.C. Hardy（吉城訳）：測色学 p71 (1944).

3) 山口：薬誌，74 1332 (1954).

Summary

Determination of surface reflectancy of the powder of Coptis root, Phellodendron bark and the mixture of both was carried out. From the data of spectroreflectance, the surface color of these was plotted on the C.I.E. color chart. It was found that the purity of these powder was determined by brightness (Y).

Received June 18, 1957

ケシの栽培品種一貫種の特性について

川谷豊彦，藤田早苗之助，大野忠郎

On the Characteristics of "Ikkanshu," a Cultural Strain of Opium Poppy

Toyohiko KAWATANI, Sanaenosuke FUJITA, and Tadaro OHNO

まえがき　1954年あへん法の制定によつて本邦にもケシの栽培が許されることになつた．その第3条にケシとは *Papaver somniferum* L. 及び *P. setigerum* DC. を指すことが明示されている．しかし一般栽培としては *P. somniferum* に限られて居り，又その品種としては一貫種が圧倒的に採用されている実状である．著者等は本品種の来歴を明らかにすると共に，1954－1955年の栽培によつて外部形態的特徴を詳細に観察し，又それらの若干とあへん及びモルヒネ収得量との相関について知見に得たので，ここに報告する．

本研究を行うに当りモルヒネを分析して戴いた当所麻薬部朝比奈部長に謝意を表する．

一貫種の来歴

一貫種の起源は三島種と称する在来種の突然変異である．三島種は福井種，台湾種等と共に1925年頃より大阪地方に普及した有望品種である．1929年頃，ケシ栽培者大阪府高槻市土室379(当時三島郡阿武野村) 向井新太郎氏[1]によれば，氏の親戚茨木市牟礼東貞次郎氏が三島種を栽培中，あへん採汁の際広い圃場の中で唯1個体が他より群を抜いて多量の乳汁分泌あるに気付き分離栽培すること数年の後，氏がこの種子を譲り受けて更に数年栽培して新品種としたものである．草性強健でモルヒネ含有率は中庸であるが，あへんの収得量優れ，実際栽培上，価値あることが認められた．かくて急速に三島郡一帯，次いで和歌山地方[2]に普及し他品種を殆んど完全に駆逐するの優位を示した．

一貫種と言う名称はあへんの反当収量が一貫匁にも及ぶ高収量を挙げ得る優良品種である処から，最初は母系三島種との区別の意味で便宜的に呼称されたことに始まり，本品種の普及と共に各地に品種名として広く採用される至つた．

実験材料及び方法

1. 実験材料

1954年和歌山地方より入手した一貫種．

2. 栽培概要

戦前のケシ栽培慣行に従つて実施した．播種，1954年10月20日．播種量，反当（以下同じ）300g．基肥，硫安1.5貫，過石0.58貫，硫加0.47貫．条間2.5尺，株間は最終間引にて概ね5寸互の目とする．除草，間引及中耕，各々3回．第1回追肥，1955年1月24日，硫安2.5貫，過石2.5貫，硫加0.9貫．第2回追肥，4月11日，堆肥100貫，魚油粕8貫，硫安4.0貫，過石3.5貫，塩加3.0貫．腋芽除去，2回．薬剤撒布，5回．

3. 供試個体の選定

生育環境並に栽培上の諸条件の全く均等な同一圃場内の各個体からランダムに予め100個体を選定しておき，盛花日（5月12日）の前日夕刻袋掛し，翌日午前袋をはずして自家授精操作を施し直ちに再び袋掛して放置し，7日後袋を除去した．かくて5月23日をあへん採集開始適期と定め，供試個体82個が決定された．

4. あへん採集の方法

切傷は隔日とし，第1回に限り2筋切傷刀を用い2条切傷し，第2回以後は3筋切傷刀を以つて3条宛逐次連続切とし，第4回切傷迄とした．あへん採集は切取及び追掻法に従つた．

---

1) 氏の子息向井源治氏の通信による（昭和32年1月25日付）.

2) 和歌山地方に入つたのは1935年頃と言われる．

5. 調査項目並にその方法

(1) 全草重　あへん採集終了当日，全草を抜き取り根を附着したまま全草生重量を測定.

(2) 草　丈　同上に於て，茎の基点より蒴果の頂端迄の長さを測定.

(3) 生果重　同上に於て，蒴果を切り落しその重量を測定.

(4) 柱頭片の数　蒴果の頂端（柱頭部）にあるdiscの裂片[3]の数を算定.

(5) 1果当あへん収得量　1果当全4回の風乾あへん総収得量.

(6) モルヒネ含有率　朝比奈及び大野(昌)(1956)の沪紙クロマトグラフィー及び分光分析による定量法に従つた.

(7) 1果当モルヒネ収得量　1果当あへん収得量にモルヒネ含有率を乗じて算定.

一貫種の特性

1. 形態の概要

1年生又は2年生の草本，草丈120−150cm，直立. 分枝は少く，2−4. 葉数は(春日部で栽培した場合)主茎に27 35，花時の生葉13−16. 葉は下位のものは大型で概ね狭長楕円形，上位のものは卵形で漸次小型となる. 葉は青緑色，葉縁に不整の欠刻又は牙歯があり下方のものは羽中裂する. 葉裏の主脉に稀に粗毛がある. 葉の基部は茎を抱く. 茎は初め軟質，後次第に硬化する. 花梗はやや彎曲し，強剛，平滑，稀に粗毛がある. 花は単弁4枚，白色. 萼片は無毛. 蒴果はやや卵形[4]，無毛，長さ 8.5cm，幅 5.0cm，未熟の蒴果は粉白緑色. 蒴果の頂端は概ね平坦であるが，詳しくは，柱頭部（disc）の中心は常に僅かに突出し柱頭片は傘状をなして放射状に周辺に向つて僅かに下向するが，先端は反転しやや上向する. 柱頭片は，10〜14，普通12. 柱頭片の主脈は直線，辺縁は強固で凹凸なく，先端は鈍円. 蒴果の外面に柱頭片の数に応じ，通常12条の隆起部[5]がある. なお果面に屡々不整形の浅い陥没がある. 果実は開裂しない. 種子は白色，千粒重 0.33〜0.36g. 花期は5月上中旬. 早生種に属する.

2. 若干の外部形態的特性と1果当あへん及びモルヒネ収得量

全草重，草丈，生果重，柱頭片の数の統計は第1表の通りである. なお1果当あへん収得量，同モルヒネ含有率，同モルヒネ収得量の統計をも第1表に示す.

Table 1. Characteristics of "Ikkanshu," a Cultural Strain of Opium Poppy. I.
Statistical Data of Some External Characters and Opium and Morphine Yield per Capsule
(determination of 82 individuals)

	Range	Mean	Standard deviation σ	Coeff. of variation (%)
Plant weight (g.)	175〜425	265.8	49.2	18.5
Plant height (cm.)	120〜148	135.6	5.3	3.9
Capsule weight (g.)	19〜44	32.2	5.4	16.9
Number of ray	10〜14	11.7	0.9	7.7
Opium yield per capsule a) (mg.)	31.7〜469.5	185.85	87.43	47.0
Morphine percentage a)	4.5〜18.1	11.38	2.76	24.2
Morphine yield per capsule a (mg.)	4.43〜65.22	21.29	12.01	56.4

a) on the air-dried basis

3) lobi stigmati; ray of disc

4) 広楕円形であるが下方がやや膨れているものが多いので卵形とする. 5) 俗に山と言う.

1果当あへん収得量及び同モルヒネ収得量は変異が著しく大きいことがわかる．

3. 1果当あへん収得量と他の外部形態的特性との相関

1果当あへん収得量と全草重，草丈，生果重，柱頭片の数，モルヒネ含有率の相関は第2表の通りである．

Table 2. Characteristics of "Ikkanshu," a Cultural Strain of Opium Poppy. II.
Correlation beween Optium Yield per Capsule and the Other Characteristics
(determination of 82 individuals)

	r	t 〔n−2〕	Significant level P
Plant weight	0.2214*	2.027	0.02<P<0.05
Plant height	0.0468	0.419	0.6 <P<0.7
Capsule weight	0.0839	0.754	0.4 <P<0.5
Number of ray	0.2561*	2.355	0.02<P<0.05
Morphine percentage	0.0612	0.548	0.5 <P<0.6

この内5％の危険率で正相関の認められたものは，(1) 全草重，(2) 柱頭片の二者である．モルヒネ含有率との相関は認めらず，この事実は注意されねばならない．

4. モルヒネ含有率と他の外部形態的特性との相関

モルヒネ含有率と全草重，草丈，生果重，柱頭片の数との相関は第3表の通りである．

Table 3. Characteristics of "Ikkanshu," a Cultural Strain of Opium Poppy. III.
Correlation between Morphine Percentage and the Other Characteristics
(determination of 82 individuals)

	r	t 〔n−2〕	Significant level P
Plant weight	0.0673	0.601	0.5 <P<0.6
Plant height	−0.0460	0.412	0.6 <P<0.7
Capsule weight	0.2174*	1.992	0.02<P<0.05
Nnmber of ray	−0.1257	1.129	0.2 <P<0.3

この内5％の危険率で正相関の認められたものは生果重のみである．

5. 1果当モルヒネ収得量と他の外部形態的特性との相関

1果当モルヒネ収得量と全草重，草丈，生果重，柱頭片の数，1果当あへん収得量，モルヒネ含有率との相関は第4表の通りである．

Table 4. Characteristics of "Ikkanshu," a Cultural Strain of Opium Poppy. IV.
Correlation between Morphine Yield per Capsule and the Other Characteristics
(determination of 82 individuals)

	r	t [n-2]	Significant level P
Plant weight	0.2315*	2.128	0.02<P<0.05
Plant height	0.0251	0.225	0.8 <P<0.9
Capsule weight	0.1869	1.702	0.05<P<0.1
Number of ray	0.1604	1.444	0.1 <P<0.2
Opium yield per capsule	0.8703***	15.808	P<0.001
Morphine percentage	0.4842***	4.953	P<0.001

この内正相関の認められたものは次の三者である.

(1) 全草重　（5%危険率）

(2) 1果当あへん収得量　（0.1%危険率）

(3) モルヒネ含有率　（0.1%危険率）

外部形態的特性の内全草重のみが有意となつたが，生果重及び柱頭片の数は有意とはならなかつたけれども，危険率は比較的低く，注意に値する．なお1果当あへん収得量，モルヒネ含有率が共に極めて高度に有意となつたことは当然であるが，二者の内あへん収得量の方が有意性がより高いことも注意に値する.

摘　要

1. 一貫種は現在本邦に於けるケシの殆んど唯一の栽培品種である.
2. 本品種の来歴を明らかにした.
3. 本品種の特性を明らかにした.

外部形態的特性：茎は直立，草丈120−150cm，分枝数（蒴果2−4）少く，花梗は太い．葉数は（春日部で栽培した場合）主茎に27〜35，花時の生葉13−16．葉は大形で厚く強剛，青緑色，葉縁は少しく波状歯縁．蕾は大きく長楕円形，末端は充実．花は大きく白．花弁4．蒴果は大，少しく脉条があり，壁は厚く，やや卵形，高さ8.5cm，巾5.0cm．果実は開裂せず．蒴果の頂端は平坦．柱頭片は辺縁強固，凹凸なく，先端は鈍円．柱頭片の数10−14，普通12．早生品種.

外部形態的特性を記載すると共に，1果当あへん収得量，同モルヒネ収得量，モルヒネ含有率等の経済的特性をも明らかにした．（第1表）

4. 1果当あへん収得量，同モルヒネ収得量，モルヒネ含有率は，それぞれ185.85mg（σ=87.43mg），21.29mg（σ=12.01mg），11.38%（σ=2.76%）であつた.

5. 1果当あへん収得量，同モルヒネ収得量，モルヒネ含有率と他の外部態的特性との相関を検定した．（第2，3，4表）この内，5%危険率に於て正相関の認められたものは次の通りである.

(1) 1果当あへん収得量と全草重

(2) 1果当あへん収得量と柱頭片の数

(3) 1果当モルヒネ収得量と全草重

(4) 1果当モルヒネ含有率と生果重

6. 1果当モルヒネ収得量と同あへん収得量，1果当モルヒネ収得量と同モルヒネ含有率には極めて高次に有意の正相関（0.1%危険率）が認められた.

文　　献

ASAHINA, H. and ŌNO, M.: *Bulletin on Narcotics*, 8, (4), 39-44 (1956).

Summary

1. "Ikkanshu" is almost the sole cultural strain of the opium poppy (*Papaver somniferum* L.) in Japan at the present moment.

2. Thə history of the strain was described.

3. The characteristics of the strain were described.

Morphological charateristics: Stem erect, 120-150 cm. high, of scanty (2-4 capsules) branching, peduncles thick. Number of leaves (when grown at Kasukabe) 27-35 on the main stem, 13-16 in living condition at anthesis. Leaves large, thick, firm, bluish green, with margin slightly undulated. Buds large, elongated oval, filled up at the ends. Flowers large, white. Petals 4. Capsules large, slightly segmented, thick walled, of more or less ovate shape, 8.5 cm. high and 5.0 cm. wide. Valves of capsules closed. Vertex of capsule, flat. Lobes of stigma with firm, smooth border, with rounded even ends. Lobes 10-14, mostly 12. Early strain.

Together with the morphological characteristics, economic ones such as opium and morphine yield per capsule, morphine percentage, etc. were described. (Table 1)

4. The opium yield per capsule, morphine yield per capsule, and morphine percentage were 185.85 mg. (σ=87.43mg.), 21.29 mg. (σ=12.01mg.), and 11.38% (σ=2.76%), respectively.

5. Correlation between each of the opium yield per capsule, morphine yield per capsule, and morphine percentage, and each of the other external characters was studied. (Tables 2, 3, and 4) Of these, positive correlation at 5% level was recognized in the following:

(1) between opium yield per capsule and plant weight

(2) between opium yield per capsule and number of ray

(3) between morphine yield per capsule and plant weight

(4) between morphine percentage and capsule weight

6. Highly significant correlation (at 0.1% level) was recognized in the following:

(1) between morphine yield per capsule and opium yield per capsule

(2) between morphine yield per capsule and morphine percentage

Received June 18, 1957

外国産ケシの外部形態的並にモルヒネ生産上の特性について

川　谷　豊　彦，藤　田　早苗之助

On the Morphological Characteristics and Morphine Productivity of Foreign Opium Poppies, *Papaver somniferum.* L.

Toyohiko KAWATANI and Sanaenosuke FUJITA

まえがき　1954年から本邦にも新たにケシの栽培が実施されることになつたが，栽培品種としては独り一貫種あるのみであり，優良品種の育成は目下の急務である．この機会に於て広く諸外国より種子を蒐集し，原産地の風土と異つた本邦に栽培した場合如何なる性状を示すであろうか，又モルヒネ生産上直ちに実際栽培に用い得る品種が得られるか否かを検し，若しそれが此の際直ちに利用することは適当でないとしても，これを基礎とし優良品種育成の交配母本となるならば，それは誠に有意義と言わねばならない．

著者等は1954－55年，1955－56年の二期にわたり，主として欧，米，濠，アジアの諸外国なかんずく欧州を主とする16ヶ国34ヶ所の植物園より蒐集した延67系統のケシを栽培し，外部形態的特性及びモルヒネ生産上の特性について観察調査し，本邦の一貫種との比較対照を行つた．これらの結果をここに報告する．

この研究を実施するに当り種子を分譲された諸外国の植物園当局に対し敬意を表する．又モルヒネを分析して戴いた当所麻薬部朝比奈部長に謝意を表し，研究を援助された当場の石原，逸見，大野各技官に感謝する．

尚前記の内モルヒネ生産上の特性についてその概要は，朝比奈，川谷，大野（昌），藤田により *Bulletin on Narcotics,* Vol. IX (1957) に発表された[2]．

実験材料及び方法

1. 実験材料

(1)　1954 -55年栽培　1953年及び1954年に主として11ヶ国，20ヶ所の植物園より蒐集した延33系統の *Papaver-somniferum*の種子．

(2)　1955--56年栽培　1954年及び1955年に主として12ヶ国，23ヶ所の植物園より蒐集した延34系統の *P.somniferum*の種子．

これらの栽培は次の耕種法に従い均等な栽培管理を行つた．

2. 栽培概要

(1)　1954－55年栽培　1954年10月20日，畦巾2.5尺に条播．整地時反当（以下同じ）石灰60貫を撒布．基肥，硫安1.5貫．過石0.58貫，硫加0.47貫．発芽，同年10月26日～30日．除草及び間引，12月14日，1955年2月22日，3月29日の3回．中耕，12月15日，3月8日，4月11日，4月22日の4回．第1回追肥，1月24日，硫安2.5貫，過石2.5貫，硫加0.9貫．第2回追肥，4月11日，堆肥100貫，魚油粕8貫，硫安4貫．過石3.5貫，塩加3貫．薬剤撒布，8斗－10斗式石灰ボルドー合剤を4月12日，4月22日，4月30日，5月6日の4回．腋芽摘除，2回．開花期は1955年5月10日～5月28日，あへん採集期は5月23日～6月12日であつた．

(2)　1955－56年栽培　栽培方法は前期栽培とほぼ同様である．播種，1955年10月25日，発芽，11月5日～10日．開花期は1956年4月22日～5月30日，あへん採集期は5月15日～6月16日にわたつた．

3. 調査方法

(1)　1果当あへん収得量　蒴果の適熟に達するを待つて採集に着手し，一般慣行法によつて乳液分泌の停止するまで通常4回切傷し，切取及び追掻法に従つた．

(2)　モルヒネ含有率　あへん量の多少により，日本薬局方VI，同変法1g法，沪紙クロマトグラフィー法[1]により当所麻薬部に於て検定された．

(3) 外部形態

草　　丈　あへん採集終了当日の茎の基部より蒴果の頂端までの長さ.

葉 の 色　成葉の色（青緑色，灰緑色，黄緑色，アントシァン着色の有無）.

花蕾の色　蕚片の色（青緑色，灰緑色，黄緑色，アントシァン着色の有無）.

花蕾の形状　側面観察による概形（長楕円形，楕円形，又は卵形）.

花蕾の刺又は粗毛の有無

花梗の太さ　（太，中，細，極細）.

花梗の性質　花後の上茎部の側面観察による姿勢（直線，又は少しく彎曲する）.

上茎部の弾力の強弱（硬，又は軟）.

花梗の粗毛の有無

花 の 色　花の最も支配的な色（赤，ピンク，濃紫，淡紫，白）.

花　　弁　単弁，重弁の区別，及び花弁先端の分裂の有無.

蒴果の巾　果実の最大直径.

蒴果の高さ　果実の基部の縊れた部分から柱頭片の付け根までの長さ．これは実用的に切傷し得る最大限の長さに当る.

蒴果表面の性状　隆起した脉条の明否．平滑，又は少しく脉条ありの何れか.

柱頭片の数　柱頭部にあるdiscの裂片の数.

柱頭部頂端の形状　頂端の凹凸（凹，凸，又は平坦）.

種子の色　種子外皮の色（黒，茶，灰，青，黄，白）.

種子の千粒重　種子千粒の重量.

実験結果

1. 生育概況

1954－55年栽培に於ては，生育期間を通じて概して平穏な気象に恵まれ順調な生育を遂げたが，あへん採集期に於て晩生種はかなり過乾の影響を受けたものがあつた.

1955－56年栽培では，播種当時より生育初期にやや多湿の傾向にあつたが，其の後の気象は概して平穏に経過し良好な生育を示した．しかしあへん採集期の頃，あたかも数度の大雨に遭遇し，あへん収量に多少の影響を与えたと思われるが，性状観察上には何等支障は無かつた.

2. 特性の詳細

各々の特性について，1954－55年栽培のものを第1表に，1955－56年栽培のものを第2表に示す．モルヒネ含有率，1果当あへん収得量，切傷期間，草丈等のデータについては既に公表した[2]ところであるが，他の形態的特性との対照を便ならしめる為特に再録した.

モルヒネ含有率と1果当あへん収得量　この二者はケシ実際栽培上の価値を決定する重要要素で，この両者共に優れた系統を探索することが本実験の主眼でもあつたが，斯くの如きものは得られなかつた.

今モルヒネ含有率について見るに，第1表，第2表から，上位10番目までのものを列挙すると第3表の如くで，これらは総て北方の植物園より到来の系統であり何れも20％以上であること，しかして1果当モルヒネ収得量は極めて低く，注目に値する．又var. *monstrosum*の2系統，No. 25及びNo. 67は共にモルヒネ含有率高く，それぞれ30.0％及び22.1％を示したことは興味深い.

Table 3. Ten Highest Morphine Percentages from Tables 1 and 2

No.	Morphine percentage	Seed origin	No.	Morphine percentage	Seed origin
25	30.0	Copenhagen, Denmark	20	23.0	Munich, Germany
64	27.5	Tabor, Czechoslovakia	67	22.1	Nantes, France
11	24.9	Cologne, Germany	90	21.2	Liege, Belgium
22	24.0	Montreal, Canada	91	21.0	Seattle, U.S.A.
19	23.6	Cologne, Germany	63	20.7	Hamburg, Germany

Table 1. Morphological Characteristics and Morphine Productivity of Foreign Opium Poppies, *Papaver somniferum* L., Cultivated at Kasukabe during 1954-55 (sown on October 20, 1954)

No.	Morphine perentage	determination method used	opium weight per capsule	Capsule incised	Period of incision	Plant height	Colour of leaves	Bud colour	Bud shape	Bud bristles or hairs	Peduncle thickness	Peduncle properties	Peduncle pubescence	Flower colour	Flower petal	Capsule width	Capsule height	Stigma surface	Stigma no. of ray	Stigma vertex	Seed colour	Seed weight of 1000 grains	Seed origin
			mg.			cm.										cm.	cm.					g.	
1c)	9.26	B	170.2	23	23–30, V	125	bluish green	bluish green	elongated oval	absent	thick	hard, curved	glabrous	white	single	3.4	5.7	segmented	11.5	flat	white	0.368	Wakayama, Japan
2c)	15.48	B	232.5	12	23–30, V	120	bluish green	bluish green	elongated oval	absent	thick	hard, curved	glabrous	white	single	3.7	6.2	segmented	11.3	flat	white	0.360	Wakayama, Japan
3c)	11.97	B	115.5	27	23–30, V	132	bluish green	bluish green	elongated oval	absent	thick	hard, curved	glabrous	white	single	4.2	5.7	segmented	12.2	flat	white	0.3[illegible]	Wakayama, Japan
4c)	7.90	B	166.1	24	23–30, V	122	bluish green	bluish green	elongated oval	absent	thick	hard, curved	glabrous	white	single	3.7	6.2	segmented	11.7	flat	white	0.361	Wakayama, Japan
5c)	12.45	B	159.1	23	23–30, V	125	bluish green	bluish green	elongated oval	absent	thick	hard, curved	glabrous	white	single	3.4	5.7	segmented	11.2	flat	white	0.371	Wakayama, Japan
6	16.71	B	60.5	30	23–30, V	120	yellowish green	yellowish green	elongated oval	absent	thin	hard, curved	glabrous	white	single	3.2	7.2	segmented	12.4	convex	white	0.365	Aichi, Japan
7	12.98	B	116.0	27	23–30, V	125	yellowish green	yellowish green	elongated oval	absent	thin	hard, curved	glabrous	white	single	4.2	6.5	segmented	13.5	concave	white	0.324	Aichi, Japan
8	13.43	B	72.2	25	27, V – 1, VI	133	yellowish green	yellowish green	ovate	absent	thick	hard, curved	pubescent	white	single	6.2	3.5	segmented	13.4	concave	yellow	0.332	Utrecht (Baarn), Netherlands
9	12.31	B	44.6	53	1–6, VI	125	yellowish green	yellowish green	oval	present	thin	soft, curved	glabrous	white	single	3.2	3.7	smooth	14.2	concave	brown	0.367	Louvain, Belgium
10	15.6	C	42.3	17	1–6, VI	135	yellowish green	yellowish green	ovate	present	thick	hard, straight	pubescent	white	single	4.4	4.7	smooth	16.4	concave	white	0.248	Turin, Italy
11	24.9	C	2.9	24	7–12, VI	150	bluish green anthocyan	yellowish green	elongated oval	absent	thin	hard, straight	pubescent	light violet	single	2.5	2.5	smooth	12.3	flat	blue	0.471	Cologne, Germany
12	19.4	C	6.9	25	1–6, VI	142	bluish green	bluish green anthocyan	ovate	present	thin	hard, curved	glabrous	violet	single	2.5	2.4	smooth	13.4	concave	black	0.251	Dublin, Eire
13a)	18.4	C	5.3	29	1–6, VI	147	bluish green	bluish green anthocyan	elongated oval	absent	thin	hard, curved	pubescent	red	double	2.5	3.0	smooth	11.6	flat	blue	0.233	Rome, Italy
14	15.2	C	4.3	30	1–6, VI	151	bluish green anthocyan	yellowish green	elongated oval	absent	thin	hard, curved	pubescent	light violet	single	2.2	3.0	semegnted	12.0	flat	brown	0.471	Liege, Belgium
15	12.7	C	4.6	34	1–6, VI	125	bluish green anthocyan	yellowish green	elongated oval	absent	thin	hard, straight	glabrous	light violet	single	2.7	3.0	smooth	14.2	concave	blue	0.434	Basle, Switzerland
16	16.1	C	2.3	26	1–6, VI	143	bluish green anthocyan	yellowish green	elongated oval	present	thin	hard, straight	pubescent	light violet	single	2.9	3.4	smooth	13.5	concave	white	0.539	Berlin-Dahlem, Germany
17	10.76	A	89.9	120	23–30, V	128	yellowish green	yellowish green	elongated oval	absent	thin	hard, curved	glabrous	white	single	4.2	6.6	segmented	12.8	concave	white	0.386	Japan, pehraps originally from North China
18	17.8	C	2.9	30	1–6, VI	133	bluish green anthocyan	yellowish green	elongated oval	present	thin	hard, straight	pubescent	light violet	single	2.0	2.7	smooth	14.4	flat	blue	0.484	Bremen, Germany
19	23.6	C	1.4	33	1–6, VI	147	bluish green	bluish green anthocyan	elongated oval	absent	thin	hard, straight	pubescent	light violet	single	2.4	3.4	smooth	14.4	flat	blue	0.272	Cologne, Germany
20	23.0	C	1.5	27	1–6, VI	140	bluish green anthocyan	bluish green anthocyan	elongated oval	present	thin	hard, straight	pubescent	light violet	single	2.2	3.2	smooth	12.1	convex	blue	0.223	Munich, Germany
21	14.6	C	4.4	37	1–6, VI	134	bluish green anthocyan	yellowish green	elongated oval	absent	thin	hard, straight	pubescent	light violet	single	2.4	3.5	smooth	12.8	flat	blue	0.568	Delft, Netherlands
22	24.0	C	1.3	22	1–6, VI	133	bluish green	bluish green anthocyan	elengated oval	absent	thin	hard, straight	pubescent	light violet	single	2.5	3.6	smooth	11.7	flat	blue	0.254	Montreal, Canada
23	15.1	C	0.3	33	1–6, VI	100	bluish green	yellowish green	ovate	absent	thin	hard, straight	pubescent	light violet	single	1.4	2.1	segmented	11.6	flat	black	0.250	Edinburgh, United Kingdom
24	15.4	C	0.2	39	1–6, VI	135	yellowish green anthocyan	yellowish green anthocyan	elongated oval	absent	thin	hard, straight	pubescent	light violet	single	3.3	3.4	segmented	12.2	flat	brown	0.508	Copenhagen, Denmark
25b)	30.0	C	0.9	44	7–12, VI	144	bluish green anthocyan	bluish green anthocyan	oval	present	thick	hard, straight	pubescent	light violet	single	2.5	3.8	smooth	11.3	flat	blue	0.565	Copenhagen, Denmark
26a)	10.4	C	0.2	28	1–6, VI	120	bluish green anthocyan	bluish green anthocyan	elongated oval	absent	thin	hard, curved	glabrous	red	double	2.7	2.6	segmented	14.1	concave	brown	0.158	Naples, Italy
92	9.0	C	36.6	29	7–9, VI	162	yellowish green	yellowish green	elongated oval	present	thin	hard, straight	glabrous	white	single	3.2	4.0	segmented	14.6	concave	brown	0.220	Rome, Italy
93a)	12.9	C	11.4	65	7–12, VI	110	yellowish green	yellowish green	ovate	absent	very thin	soft, curved	glabrous	pink	double	2.2	2.8	segmented	12.4	flat	brown	0.242	Adelaide, Australia
94	17.6	C	39.2	32	7–12, VI	132	bluish green anthocyan	yellowish green	elongated oval	present	thin	hard, straight	pubescent	light violet	single	2.2	2.7	smooth	13.4	convex	blue	0.566	Braunschweig, Germany
95	15.8	C	8.0	57	7–12, VI	125	yellowish green	yellowish green	oval	absent	thin	hard, straight	pubescent	violet	single	3.2	2.2	smooth	12.4	concave	brown	0.312	London, United Kingdom
96	16.0	C	1.9	48	7–12, IV	145	bluish green anthocyan	bluish green anthocyan	elongated oval	present	medium	hard, straight	pubescent	red	single	3.0	4.0	smooth	12.3	flat	brown	0.367	Amsterdam, Netherlands
97	14.3	C	18.4	33	7–12, VI	140	bluish green anthocyan	anthocyan	oval	absent	thin	hard, straight	pubescent	light violet	single	3.0	3.0	smooth	12.5	flat	brown	0.358	Amsterdam, Netherlands
98	14.8	C	1.7	64	1–6, VI	160	yellowish green anthocyan	yellowish green antho cyan	elongated oval	absent	thin	hard, straight	pubescent	light violet	single	4.0	4.0	segmented	12.1	concave	brown	0.216	Turin, Italy

Table 2. Morphological Characteristics and Morphine Productivity of Foreign Opium Poppies, *Papaver somniferum* L., Cultivated at Kasukabe during 1955–56 (sown on October 25, 1955)

No	Morphine percentage	Determination method used	Opium weight per capsule	Capsule incised	Period of incision	Plant height	Colour of leaves	Bud colour	Bud shape	Peduncle bristles or hairs	Peduncle thickness	Peduncle properties	Peduncle pubescence	Flower colour	Flower petal	Capsule width	Capsule height	Capsule Surface	Stigma no. of ray	Stigma vertex	Seed colour	Seed weight of 1000 grains	Seed origin
58	11.0	C	mg. 47.4	17	15–19, V	cm. 65	yellowish green	yellowish green	oval	absent	thin	hard, curved	glabrous	red	single	cm. 4.2	cm. 4.2	smooth	10.2	concave	yellow	g. 0.274	Formosa, China
59[c]	11.14	B	157.4	25	28, V–3, VI	114	bluish green	bluish green	elongated oval	absent	thick	hard, curved	glabrous	white	single	5.0	6.7	segmented	12.3	flat	white	0.361	Wakayama, Japan
60	15.41	B	83.2	15	28, V–3, VI	126	bluish green	yellowish green	elongated oval	absent	thick	hard, curved	glabrous	white	single	9.5	5.3	segmented	14.6	flat	yellow	0.332	Utrecht Baarn, Netherlands
61	10.3	C	38.1	17	6–10, VI	102	bluish green	bluish green	ovate	present	thin	hard, curved	pubescent	light violet	single	3.0	2.8	smooth	10.3	concave	blue	0.214	Parma, Italy
62[a]	18.8	C	10.9	23	6–10, VI	91	yellowish green	yellowish green	ovate	absent	very thin	soft, much curved	glabrous	pink	double	2.7	2.8	smooth	12.8	convex	brown	0.252	Adelaide, Australia
63	20.7	C	51.5	12	11–15, VI	126	yellowish green	yellowish green	ovate	absent	medium	hard, straight	pubescent	light violet	single, dissected	3.9	3.7	smooth	14.6	flat	grey	0.252	Hamburg, Germany
64	27.5	C	22.9	8	11–15, VI	141	yellowish green	yellowish green	elongated oval	present	medium	hard, straight	pubescent	light violet	single	3.3	4.6	segmented	13.2	concave	grey	0.321	Tabor, Czechoslovakia
65	16.4	C	34.9	4	11–15, VI	137	yellowish green	yellowish green	elongated oval	absent	medium	hard, straight	pubescent	light violet	single	3.9	4.2	segmented	14.4	flat	blue	0.216	Delft, Netherlands
66	15.56	B	60.4	19	6–12, VI	135	bluish green	bluish green	ovate	absent	medium	hard, straight	pubescent	violet	single	6.1	3.6	segmented	14.1	concave	brown	0.150	Strasbourg, France
67[b]	22.1	C	32.0	5	11–15, VI	146	bluish green	bluish green	elongated oval	present	thick	hard, curved	pubescent	violet	single	3.1	3.0	smooth	12.8	flat	brown	0.234	Nantes, France
68[a]	11.7	C	40.5	6	11–15, VI	137	yellowish green	yellowish green	elongated oval	absent	thick	soft, curved	pubescent	red	double	3.4	4.0	smooth	10.9	convex	brown	0.150	Bratislava, Czechoslovakia
69	14.5	C	51.4	18	17–22, V	51	yellowish green	yellowish green	oval	absent	medium	hard, curved	glabrous	red	single	4.1	4.2	smooth	10.2	concave	yellow	0.282	Formosa, China
70	17.34	B	102.0	23	3–9, VI	128	greyish green	yellowish green	ovate	absent	thick	hard, straight	glabrous	white	single	5.7	4.7	smooth	12.7	concave	white	0.332	Louvain, Belgium
71[c]	13.30	B	184.9	12	28, V–3, VI	121	bluish green	bluish green	elongated oval	absent	thick	hard, curved	glabrous	white	single	5.4	7.8	segmented	12.6	flat	white	0.332	Wakayama, Japan
72	19.2	C	38.0	18	11–15, VI	151	bluish green	yellowish green	elongated oval	absent	medium	hard, curved	glabrous	light violet	single, dissected	4.0	3.6	smooth	13.6	convex	brown	0.218	Seattle, United Staes of America
73	19.8	C	25.5	9	11–15, VI	151	yellowish green	yellowish green	ovate	absent	medium	hard, straight	pubescent	light violet	single	3.7	4.0	segmented	11.9	convex	blue	0.254	Braunschweig, Germany
74	17.1	C	25.6	9	11–15, VI	154	yellowish green	yellowish green	elongated oval	absent	medium	soft, curved	pubescent	light violet	single	3.5	3.4	smooth	11.6	concave	brown	0.360	Lodz, Poland
75	14.6	C	53.8	15	3–9, VI	130	bluish green	bluish green	elongated oval	absent	thick	soft, curved	glabrous	white	single	8.0	6.8	segmented	12.5	concave	yellow	0.248	Florence, Italy
76	16.0	C	26.0	12	6–12, VI	121	bluish green	bluish green	elongated oval	absnet	medium	hard, curved	pubescent	light violet	single, dissected	4.0	2.3	smooth	13.8	concave	grey	0.280	Florence, Italy
77	17.82	B	84.2	15	3–9, VI	135	greyish green	yellowish green	ovate	absnet	thick	hard, curved	glabrous	white	single	5.9	4.3	segmented	12.4	concave	white	0.367	Louvain, Belgium
78[c]	14.13	B	205.5	12	28, V–3, VI	116	bluish green	bluish green	oval	absent	thick	hard, curved	glabrous	white	single	4.9	7.1	segmented	12.7	flat	white	0.360	Wakayama, Japan
79	18.6	C	16.8	9	6–10, VI	145	yellowish green	yellowish green	elongated oval	absent	medium	hard, curved	pubescent	light violet	single	4.5	4.3	smooth	12.7	concave	blue	0.373	Lodz, Poland
80	17.5	C	31.2	12	6–10, VI	136	bluish green	bluish green	elongated oval	absent	medium	hard, curved	pubesecnt	light violet	single	4.7	4.2	smooth	12.2	concave	blue	0.451	Bonn, Germany
81[a]	13.9	C	21.4	12	14–16, VI	127	greyish green	yellowish green	ovate	absent	medium	soft, curved	pubescent	violet	double	3.4	3.5	smooth	11.4	convex	brown	0.217	Nantes, France
82	17.7	C	56.9	16	11–15, VI	108	yellowish green	yellowish green	elongated oval	present	thin	soft, curved	pubescent	violet	single	2.9	2.6	smooth	12.5	convex	blue	0.222	Besancon, France
83	18.2	C	47.2	10	11–15, VI	94	greyish green	yellowish green	ovate	absent	thin	hard, straight	glabrous	violet	single	2.2	1.7	smooth	12.6	flat	brown	0.081	Dublin, Eire
84	14.70	B	98.3	12	3–9, VI	131	bluish green	bluish green	elongated oval	present	thick	hard, curved	pubescent	white	single	6.1	5.0	smooth	14.8	concave	brown	0.249	Turin, Italy
85[c]	15.97	B	184.2	23	28, V–3, VI	116	bluish green	bluish green	oval	absent	thick	hard, curved	glabrous	white	single	5.7	7.8	segmented	12.5	flat	white	0.341	Wakayama, Japan
86	14.9	C	63.4	12	6–10, VI	120	greyish green	yellowish green	elongated oval	absent	medium	soft, curved	pubescent	red	single	3.0	2.6	smooth	11.7	convex	blue	0.210	Besancon, France
87	17.1	C	45.2	6	11–15, VI	138	yellowish green	yellowish green	elongated oval	present	medium	hard, curved	pubescent	light violet	single	2.6	3.3	smooth	12.8	convex	blue	0.296	Bremen, Germany
88	15.2	C	101.6	4	3–9, VI	125	bluish green	bluish green	elongated oval	absent	thick	hard, curved	glabrous	violet	single	8.7	4.9	segmented	16.3	concave	brown	0.277	Taranto, Italy
89[a]	14.3	C	16.1	52	3–7, VI	97	yellowish green	yellowish green	ovate	absent	thin	soft, much curved	glabrous	red	double	2.4	2.0	smooth	10.4	flat	brown	0.161	Lisbon, Portugal
90	21.2	C	36.5	4	11–13, VI	134	yellowish green	yellowish green	ovate	present	medium	hard, curved	pubescent	light violet	single	3.4	4.4	smooth	10.2	flat	brown	0.210	Liege, Belgium
91	21.0	C	12.9	8	11–13, VI	143	yellowish green	yellowish green	ovate	absent	thick	hard, straight	pubescent	pink	single	3.9	4.7	smooth	12.7	convex	brown	0.301	Seattle, United States of America

Method used :
A, Japanese Pharmacopoeia VI method
B, Slightly modified J. P. VI method using 1 g. of opium
C, Paper chromatographic method by Asahina and Ōno (1956)

a) var. *plenum*
b) var. *monstrosvm*
c) "Ikkanshu"

本邦の一貫種はモルヒネ含有率としては7.90～15.97%，平均12.4%[a]で中位を示したが，1果当あへん収得量は115.5～232.5mg，平均175.0mg[a]で極めて大きい．第1表，第2表に明かなように，1果当150 mg以上の収得量を示したものはすべて一貫種のみである．

切傷期　外国産は概して一貫種より晩生で，一貫種より早生のものはNo. 58，No. 69台湾産のみであつた．切傷期の早いものは従つて開花期の早いものはあへん収得量が比較的多く，晩いものはモルヒネ含有率が比較高いようである．

草丈　最も低いもの51cm，最も高いもの162cm，平均128cm．120～140cm のものが多い．外国産のものは概して草丈が高い．最低は台湾産の51～65cmで，葉数も少く早生である．本邦の一貫種は中位である．

葉及び蕾の色　勿論緑色を基本とするが系統により色彩を異にする．青緑色，黄緑色のものが多く，灰緑色のものは少い．これは蕾についても同様であつた．

葉にアントシァン着色のものは花は有色であつた．蕾の場合は概ね花は有色であるが，若干の例外があつた．

蕾の形，刺又は粗毛の有無　長楕円形，楕円形のものが多く，卵形のものは少かつた．刺又は粗毛を生ずるものは少かつた．

花梗の太さ，性質，毛の有無　系統により花梗の太さ，硬軟を異にする．花後の花梗は直線のものと少しく彎曲するものの別があるが，強く彎曲するものは稀であつた．花梗に有毛のものは稀であつた．

花の色　大別して赤，紫，白の3系統に区別され，それぞれ濃淡の多くの段階がある．詳しくは (i) 花の周辺が赤系統で中心部白又は紫系統，(ii) 周辺が紫系統又は白で中心紫系統，(iii)周辺中心ともに白，の3群となる．周辺紫系統で中心部白のものは認められなかつた．

外国産には花色の有色のものが多かつた．花の色とあへん収得量及びモルヒネ含有率とは相関があるようである．即ち白色のものはあへん収得量は多いがモルヒネ含有率低く，これに反し赤花又は紫花のものはあへん収得量は少いがモルヒネ含有率は高い．

花弁　単弁のものが大部分で，重弁のものは稀であつた．重弁のものにあへん収得量大なるものは無かつた．

蒴果の形状　大別して楕円形，広楕円形，球形，円錐形，平坦形の5形がある．概して巾より高さの大なるもの即ち長型のものが多かつた．果実の大きい系統程あへん収得量の多い傾向は認められなかつた．又果実の形と花の色との相関もなかつた．

蒴果の表面　平滑なものと，隆起した脉条の比較的明らかなものとがあつた．

柱頭片　同一系統又は植物では明らかに蒴果の大きい程柱頭片の数も多い．柱頭片の構造に2型がある．その一つは柱頭片の辺縁は強固で凹凸なく先端は鈍円，主脈は直線である．他の一つは辺縁は纎弱で少しく凹凸があり先端は不等の鈍歯牙がある．この型では主脈は少しく蛇行状のことが多い．

柱頭部頂端の形状　平坦なもの，凹のもの，凸のものの3型がある．これらの程度の差は様々で，例えば凹の極端な場合は柱頭片は殆んど直立しあたかも茶碗状であり，又凸の極端な場合は帽子状である．

種子の色　黒，茶，灰，青，黄，白に区別されそれぞれ濃淡の段階がある．花の色とは密接な関係があるようである．白花のものの種子は概ね白又は黄色，赤花紫花のものは概ね青，灰，茶，黒色であつた．

種子の千粒重　最も軽いもの0.081g，最も重いもの0.568g，平均0.312g．0.300～0.350g程度のものが多い．

摘　　要

あへん用ケシの品種改良を目的として，1954～55年及び1955～56年の二期にわたり，主として欧，米，濠，アジアの諸外国なかんずく欧州を主とする16ケ国34ケ所の植物園より蒐集した延67系統のケシを春日部薬用植物栽培試験場に於て栽培し，多部形態的並にモルヒネ生産上の特性について詳細に観察調査し，本邦の一貫種との比較対照を行つた．（第1表、第2表）

1. モルヒネ含有率と1果当あへん収得量ともに同時に優れた系統はなかつた．上位10番目迄のモルヒネ含有率を与えたものは総て北方の植物園より到来の系統であり何れも20%以上，最高は30.0%を示し，注目に値する．しかしあへん収得量は低い．（第3表）

---

[a]川谷，藤田，大野：ケシの栽培品種一貫種の特性について，衛生試報，75，○○○－○○○ (1957) のデータ11.38%，185.85mgとほぼ一致する．

2. これに対し本邦の一貫種は12.4%を示し，モルヒネ含有率としては中位であつた．しかし1果当あへん収得量は175.0mgを示し，全系統の中で最大であつた．

3. var. *monstrosum*の2点が共にモルヒネ含有率が高く，30.0%と22.1%を示したことは興味深い．

4. 外国種は，台湾種を除き，概して一貫種に比較して晩生であつた．晩生のものは切傷期が水稲植付期又は梅雨期に合致するので，本邦の気候に望ましくない．早生のものは概してあへん収得量が多く，晩生のものはモルヒネ含有率が比較的高いようである．一貫種は早生に属する．

5. 外国種は概して草丈が高い．但し台湾種は例外で，草丈極めて低く，葉数少く早生である．一貫種の草丈は中位であつた．

6. 外国種は花色の有色のものが多かつた．白花のものはあへん収得量は多いがモルヒネ含有率低く，これに反し有色花のものはあへん収得量は少いがモルヒネ含有率は高いようである．

7. 花弁は単弁のものが普通で重弁のものは稀であつた．重弁の系統にはあへん収得量の大なるものはなかつた．

8. 蒴果の大きい系統のものが必ずしもあへん収得量の多い傾向は認められなかつた．

9. 種子の千粒重は0.081～0.568g，平均0.312g．0.300～0.350g程度のものが普通であつた．

文　献

1. ASAHINA, H. and ŌNO, M.: *Bullietin on Narcotics*, 8, (4), 39–44 (1956).
2. ASAHINA, H., KAWATANI, T., ŌNO, M., and FUJITA, S.: *Ibid.*, 9, (2), 20–33 (1957).

Summary

For the sake of plant breeding, during the two seasons, 1954–55 and 1955–56, 67 forms of the opium poppy, *Papaver somniferum* L., mostly collected from 34 botanic gardens of 16 different countries, chiefly in Europe, partly in North America, Australia, and Asia, were cultivated at the Kasukabe Experiment Station of Medicinal Plants. The morphological characteristics of these foreign forms and their morphine productivity were studied in detail, and compared with those of "Ikkanshu," a cultural strain of Japan. (Tables 1 and 2)

1. No form was found that excelled both in morphine percentage and in opium yield per capsule. It is remarkable that the ten highest morphine percentages were on opium of the poppies of which the seeds came from certain quite northern botanic gardens, and they were above 20%, the highest being 30.0%, but the opium yield per capsule was very low. (Table 3).

2. Contrary to the high morphine percentages in some foreign forms, "Ikkanshu" gave 12.4%, being the medium results. However, opium yield per capsule of "Ikkanshu" was 175.0 mg., being the greatest in all the forms.

3. It is very interesting to observe that both the two forms of var. *monstrosum* gave very high morphine percentages, 30.0% and 22.1%.

4. The foreign forms, except the Formosan ones, were mostly later forms in comparison with "Ikkanshu." Later forms are unsuitable to the climate of Japan, since the period of incision falls in with the rice planting season or the rainy season. It seemed that the earlier forms, as a rule, gave more opium yield, whereas the later forms showed higher morphine percentages. "Ikkanshu" was an early form.

5. The foreign forms were mostly of tall habit. The only exception was the Formosan ones, which were of extremely short habit, less leafy, and early. "Ikkanshu" was of medium habit.

6. The foreieign forms had mostly coloured flowers. It seemed that the forms with white flowers gave more opium yield but lower morphine percentages, whereas those with coloured flowers gave less opium yield but higher morphine percentages.

7. The foreign forms had mostly single flowers. None of the forms with double flowers gave more opium yield.

8. The forms with larger capsules did not always give more opium yield.

9. The weight of 1000 grains of seed was 0.081–0.568 g.; mean, 0.312g.; mostly 0.300–0.350g.

Received June 18, 1957

タマサキツヅラフジの試植栽培（第2報）

実生栽培について（その2）

石 原 活 磨

Trial Cultivation of *Stephania cepharantha* HAYATA. II.

Cultivation by Seeds. 2.

Katsuma ISHIHARA

まえがき　著者は衛試報第74号においてタマサキツヅラフジの実生栽培法について試植試験した成績の一部をその1として報告したが，引続き実験した結果をその2として，ここに報告する．

本実験はタマサキツヅラフジの純国産化を主目として次の5項目について実施した．

報文の作成に当り御指導を賜つた川谷場長，協力された大野技官に深謝する．

実験調査項目（梗概）は次の通りである．

7. 耕種標準.
8. 収実量に関する調査.
9. 発芽期と塊根発育に関する調査.
10. 地上茎葉部発育と塊根発育について.
11. 内地栽培の生育季に関する調査.

7. 耕種標準（梗概）

外地より新しく導入した熱帯薬用植物の栽培は、何れの場合でも原産地とは地勢気候及び土質等の生育環境を異にする場合が多い．殊に本植物の様な自生野草の栽培化は困難な事項が多いので幾多の創意工夫と永い年月を要する場合が多い．下記は春日部試験場の実験から作成した栽培標準であるが未だ完璧のものではなく今後改善を要する事項が残つている．

栽培適地は温暖適湿の肥沃腐植質砂壌土，生育適温は18.5°Cから26°C間にあるようだ．

繁殖期	4月中旬	気温	12.5°C
発芽期	5月中旬	〃	17.5°C
分枝期	6月上旬	〃	22.7°C
出穂期	6月中旬	〃	23.9°C
盛花初期	7月下旬	〃	29.1°C
収実初期	8月上旬	〃	27.7°C
収実盛期	9月上旬	〃	27.0°C
収根初期	11月下旬	〃	10.1°C

上述本植物の生育日数は200日内外である．

8. 収実量に関する調査

第22表

株別	百穂当の収実量			果実百果重量	種子百粒重量
	収果数	収果重	収実重		
優株	1460果	370g	58.21g	143.18g	34.09g
中株	1500	304	41.33	125.75	32.40
小株	760	126	35.52	104.48	27.10
平均	1240	266	45.02	124.46	31.19

第22表は本植物の実生栽培の基礎的事項として重視される採種についての調査成績である．供試種用塊根を優株・中株・小株の三級別とし，2年生株について行つた．本表の示数は実験株100株について行つた1株当りの平均収実量である．なお不適環境下においても各12区の調査区を設けて行つたが採種量が少い許りでなく大部分の種子が不稔又は病菌に侵され純良種子は得られなかつた．

9．発芽時期と塊根発育に関する調査

第23表

発芽月日	平均気温	発芽歩合	収根重	収根重比	積算温度
5月13日	18.21°c	100.00%	105.0g	100.00%	4001°c
6月1日	21.80	94.44	80.0	74.07	3666
6月20日	24.70	87.80	65.0	61.90	3260
7月10日	28.50	84.61	30.0	28.57	2712
7月30日	30.42	11.00	20.0	19.04	2285
8月20日	27.48	10.00	7.0	6.66	1747
9月10日	25.26	10.00	1.6	1.52	1211

第23表を考察するに発芽期日の早いもの程生育が良好であつた．発芽後気温の上昇に伴い植物栄養の分解及び吸収が順次旺盛度を加えて，生長が著しく促進されたが，これに反して7月以降発芽したものは未発育中に秋末の低温期を迎え，塊根の伸長肥太生長が遂げられなかつた．例年結霜は10月下旬である．要約するに理想の生育期間は5月から10月までの180日間であり，この間の積算温度は大約3,600°C内外であることが明らかとなつた．全生育期間中の平均気温は20.5°Cであつたが，考察するに本植物の理想発育の条件としては日光・水分・気温・肥料だけではなく，植物自体を四囲から庇護する（肥培保護木）が強風・強光・過乾等を防除する効果は大きいようである．コカ，コーヒー，カカオ等の栽培には庇護用植物は絶対必要である．従つて相当海抜の高い冷地であつても山間の窪地等は予想外に良生育を示すものである．（例＝埼玉県秩父長瀞，及び兵庫県宝塚地方）

10．地上茎部発育と塊根発育について

第24表

株別	根重	茎葉重	根径	根長	枝根数	茎の太さ	茎長	1株茎数	茎重百に対する根重比
	g	g	cm	cm	本	cm	cm	本	%
優株	144	207	4.76	47.40	9.8	0.42	360	3	69.56
良株	113	177	4.13	44.31	10.2	0.35	364	2	64.97
中株	82	148	3.51	26.23	5.9	0.28	368	1	55.40
小株	35	177	2.09	44.31	4.3	0.40	224	1	19.77

第24表は供試面積60坪に4,600粒の種子を4月15日に播種したものの調査成績である．全収穫根について考察すると，1株重110g以上の優位級株が27.39%，50g．以上の良位級株が24.16%，15g．以上の中位級株が37.06%，4g．以上の小位級株が9.82%，0.65g以上の最小級株が1.57%の収根率を示した．

第25表

株別	根重	茎葉重	着葉数	葉片長	葉巾	葉柄長	草丈	根長	根径
	g	g	枚	cm	cm	cm	cm	cm	cm
優株	174	182	230	2.4	3.2	3.5	450	65	1.6
良株	110	128	190	2.2	2.6	3.3	320	54	0.8
中株	90	170	160	1.8	2.3	2.1	310	39	0.6
小株	80	70	150	1.7	2.2	1.9	310	39	0.6

第25表を考察するとき塊根部の発育良否は各株の発生茎数と茎の細太の差にも左右される場合もあるが，茎部の伸長及び分枝数並びに葉柄長と葉片面積の広狭の差によつて著しい発育差を示すものである．

11．内地栽培の生育季に関する調査

本植物の栽植期と収根期を理想的に定める為には気象学的に気温と地温との変化状態を調査究明するの必要が

ある.

第 26 表

時期	月	旬	気温 °C			地温 °C		
			最高	最低	平均	10cm.	20cm.	30cm
植付期	4.	上	19.07	7.88	14.45	12.90	12.85	12.54
		中	19.28	8.94	14.85	14.72	14.58	14.63
		下	19.30	10.54	15.65	14.77	15.00	15.08
発芽期	5.	上	21.36	11.78	17.55	15.70	15.73	15.84
		中	22.95	12.40	18.41	17.94	17.84	17.85
		下	22.60	12.45	19.20	18.33	18.27	18.27
収根期	11.	上	20.31	6.88	15.65	12.50	22.85	14.30
		中	15.25	5.22	14.85	10.87	15.00	12.24
		下	14.52	3.75	14.45	10.67	14.58	11.77

a） 発芽の適温が5月中旬頃であるから栽植期はそれより1カ月早い4月中旬とすることが理想的である．この頃の地温と気温差は1～2 °C位である.

b） 収根標準期は11月から12月上株頃で気温が 11°C から 14°C 位の時期が良いようである．埼玉県春日部市地方では12月下旬から翌年2月までの間は寒冷の為，根頭部が凍傷をうけるから株上を石灰木灰藁等を以て覆い保護する必要がある．厳冬中の根腐れは多湿と寒風による場合が多いが，静岡以西の温暖地での栽培は防寒の必要がない.

総　括

本試験成績を考察すれば大要次のとおりである.

8） 実生2年生の塊根を栽植して，採種量の調査を行つたが1株当りの平均収実量は1,240粒，その重量は4.5g. この中で純良稔実種子は総結実量の 87 %内外である.

9） 播種期と生育との関係を調査した結果，5，6月中に播種するのが有利であることを認めた．日本内地の栽培には各日の平均気温が 20.1°C．積算温度は 3,800°Cを必要とする．年間で育成の可能日数は 200日以下であることが明となつた.

10） 塊根の発育は地上茎葉の繁茂と密接の関係があつて，営利的生産栽培には特に茎葉部の発育を計るように肥培管理することが必要である.

著者は上述の試植試験を経てはじめて熱帯産薬用植物の温帯地栽培化に成功した.

文　献

1） 石原：衛生試報，74，407－419 (1956).

2） 長谷川：化療研報，3，No. 1－4 (1949).

3） 石原：化研生玉咲栽培法 (1942).

Summary

Results obtained are summarized as follows : —

8） Cultivation experiments were made with the second year growth of this plant, and the yield of seed-setting were examined. The average number of seed-setting per plant was 1240, and the weight was 4.5g.

The ratio of good seeds to the whole harvested was about 87%.

9） Relation between the sowing time and the growth was studied. It was recognized that the sowing was preferable during May and June. For the cultivation of this plant in Japan, it is found that more than 20.1°C of the average daily temperature and more than 3800°C of integrating temperatures are necessary.

It has proved that growing period of this plant in Japan is less than 200 days.

10) The growth of tuberous roots is closely correlated with that of the stems and leaves, and therefore for the practical cultivation the manuring and management should properly be done in order that the growth of stems and leaves may be hastened.

The author has thereby succeeded in cultivating of this tropical medicinal plant in the temperate zone of Japan.

Received June 18, 1957.

レモングラスの生育並に含油量の時期的変化（第2報）*

植付2年度の成績

宮崎幸男

Seasonal Variations in the Growth and Oil content of Lemon-Grass II.

Results in the Second Year after Planting.

Yukio MIYAZAKI

緒　　　言

著者等は第1報[5]に於て植付初年度に於けるレモングラスの生育並に含油量の外チトラール含量等の時期的変化について報告した．本報に於ては2年度に於ける之等時期的変化の結果について報告するのであるが，本年度に於ては初年度には調査されなかつた5月頃迄の比較的低温の時期に於ける生育状態や又同じく初年度に於て調査されなかつた7月初，中旬頃迄の即ち盛夏に至る頃迄の含油量やチトラール含量の変化の状態を調べると共に更に其の後の初年度と同じ時期に於ける之等時期的変化の状態をも調べ，両年度に亘る之等時期的変化の全般的な傾向を明かにする事を目的とし，両年度間の之等時期的変化の差異や又之等時期的変化の主な原因についても更に考察を加える事とした．

本研究は一部厚生科学研究費の補助の下に行われたので玆に謝意を表する．

材料及び方法

材料　第1報の第2実験に於て圃場に定植した240株の中126株が初年度に収穫され残る114株を本年度の実験に供試した．

方法　a）耕種概要　**施肥**　1株当硫安，過燐酸石灰共に5.6匁，塩化加里1.5匁を第1回は4月26～28日，第2回は7月2～3日，第3回は9月2～6日に施用した．**除草・中耕**　初年度と同様の方法によつた．**病虫害**　第1報で述べたいねよとう *Sesamia inferens* WALKER の被害は6月初旬頃迄は比較的少かつたが中旬頃からやや見られ其の後全期間を通じて若干の被害が見られた．然し之に対しては初年度の場合と同様特別の防除法は行わなかつた．又其の他特に注意を惹く様な病虫害は認められなかつた．**其の他の事項**　9月18日の台風14号の来襲により葉の先端裂開し且つ折落したものが多かつたが其の後の生育には左程影響はない様に思われた．其の他特に注意すべき事項は認められなかつた．b）生育調査　昭和29年4月19日より初年度の場合と同様大体1週間毎に草丈並に分蘖数の調査を行い夫々翌年3月28日及び1月31日迄行つた．c）収穫　6月22日より7月20日迄は2週間々隔，其の後3月29日迄は3週間々隔に初年度と同様の方法で収穫を行なつた．
d）生葉の含水率　収穫株の中3～5株について代表的な分蘖2～3本をとり6月22日より7月6日迄は上位より第3，4葉の2枚，7月20日より8月10日迄は第3，4，5葉の3枚，8月31日からは第4，5，6，7葉の4枚を供試して初年度と同様の方法で生葉の含水率を測定した．e）含油量，チトラール含量，比重並に屈折率 比重の測定には大体に於て5ccのオストワルド氏比重瓶を使用した外は総て第1報の第2実験と同様の方法によつた．

実験結果

1. 地上部の生育過程

第1報で述べた様に初年度に於ては2月初旬頃には地上部の枯死状態は大体極点に達するが，3月中旬頃には株の中心部に新葉が1，2枚発生し始め其の後気温の上昇と共に徐々に新葉の生育が進む．本年度に於ける生育調査は4月19日に開始したが圃場に残存した114株は全部越冬しており寒害の為に枯死した株は全然無かつた．然し此の頃は草丈は未だ極めて低く分蘖数も亦極めて少い．其の後気温の上昇と共に生育は次第に旺盛になるのであるがその過程は次の様である．

---

* 本報告は昭和31年4月第111回日本作物学会講演会に於て発表された．

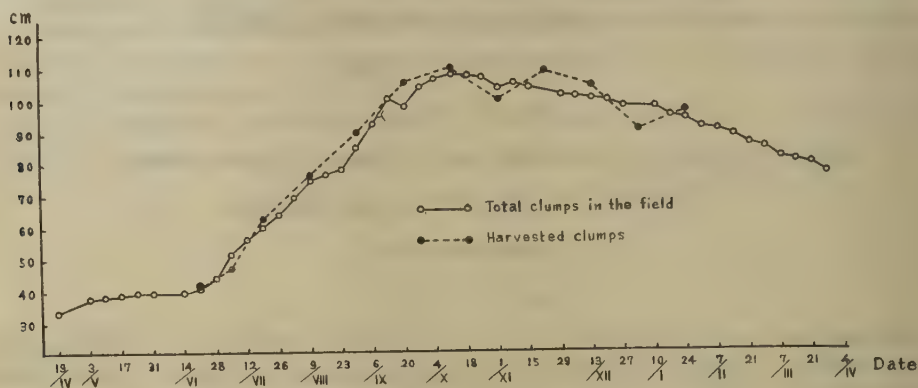



Fig. 1. Growth Curve of the Height of Lemon-Grass.

先ず草丈についてみるに第1図に見られる様に4月中旬頃は僅かに30cm余で極めて短く其の後6月中旬頃迄は草丈の伸長は極めて緩慢である．其の後草丈の伸長は次第に旺盛になり6月下旬乃至7月初旬頃より9月中，下旬頃迄は最も旺盛の傾向が見られる．9月18日の台風14号で草丈は一時低下したが其の後再び伸長を示し大体10月初，中旬頃最高に達するものの様である．そして其の後は徐々に低下の傾向を示している．

分蘖数についてみると第2図に示した様に4月中旬頃は30cm以上の分蘖数は平均1本にも達しない状態であり其の後も6月初，中旬頃迄は分蘖数の増加も亦極めて緩慢である．其の後分蘖数の増加は次第に旺盛となり8 9月頃にかけて特に旺盛の傾向が認められる．其の後再び緩慢となり大体10月初，中旬から11月初，中旬頃にかけて分蘖数は最高に達する様である．そして其の後は徐々に減少の傾向を示している．

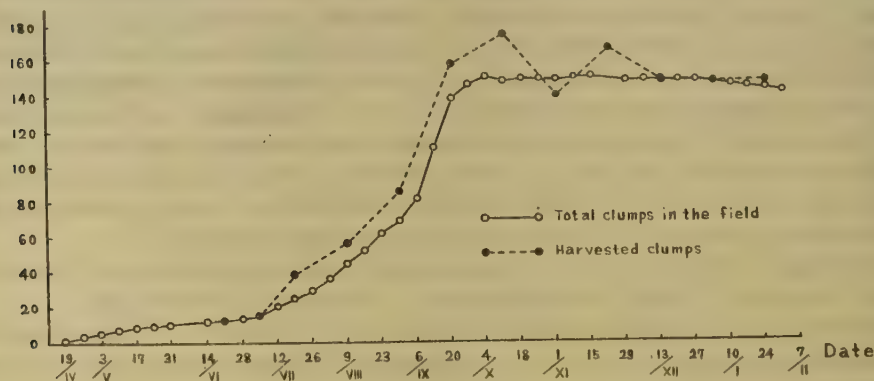



Fig. 2. Growth Curve of the Number of Tillers of Lemon-Grass

実験期間中の主な気象条件を第1表に示したが4月中旬頃より6月初，中旬頃迄は草丈，分蘖数の増加共に極めて緩慢であるのは此の頃迄の気温がレモングラスの生育にとつては低過ぎる事によるものと思われる．更に本年度の気温は昨年度に比べて4月初，中旬はやや高いが5月下旬頃より7月下旬頃迄は全般的にやや低かつたので此の頃の生育は一層悪かつたものと考えられる．然し其の後の草丈の伸長並に分蘖数の増加の状態又之等の最高に達する時期更に其の後の低下の状態等については初年度の場合と大体同様の傾向が見られるわけである．唯11月以降冬季の気温が本年度は昨年度乃至一昨年度に比べてかなり高く，特に最低気温の平均，絶対共に相当高い傾向が認められるが，之は植物の枯死状態に相当影響を及ぼし昨年並に一昨年に比べて枯死状態の進み方が若干遅れる傾向が見られた．即ち1月初旬に於ける葉身の寒害による乾燥状態は本年度は昨年度乃至一昨年度に比

Table 1. Chief Climatic Factors during the Experiment

Date	Air temperature					Rainfall	Number of hours with sunshine	Number of days with frost
	Mean	Maximum		Minimum		Total	Total	Total
		Mean	Absolute	Mean	Absolute			
	C°	C°	C°	C°	C°	mm		
Ⅳ 6 1954	15.2	19.6	21.8	10.8	6.2	104.0	39.9	0
13 〃	15.8	19.0	21.0	12.5	8.8	70.4	30.0	0
20 〃	15.3	19.3	21.5	11.4	2.8	153.2	39.9	0
27 〃	13.4	18.9	21.3	7.9	4.4	43.0	27.4	0
Ⅴ 4 〃	16.3	20.2	22.1	12.5	8.2	99.2	39.8	0
11 〃	17.7	21.9	24.5	13.5	10.1	81.4	55.3	0
18 〃	17.8	21.5	23.8	14.0	10.0	17.9	21.0	0
25 〃	17.7	20.7	23.4	14.6	11.2	55.7	19.7	0
Ⅵ 1 〃	17.8	21.5	23.3	14.1	10.2	90.6	39.3	0
8 〃	18.8	21.8	25.2	15.8	13.7	143.7	22.2	0
15 〃	18.9	21.7	23.9	16.0	12.5	32.4	33.6	0
22 〃	19.9	22.0	24.0	17.7	15.8	76.0	12.7	0
29 〃	21.7	23.5	26.4	19.9	18.3	177.3	10.3	0
Ⅶ 6 〃	21.7	23.9	25.2	19.4	17.6	80.9	8.4	0
13 〃	21.5	23.7	27.0	19.3	18.0	18.0	19.9	0
20 〃	21.6	25.5	26.4	17.7	15.0	0	38.1	0
27 〃	25.3	27.0	28.2	23.7	19.3	8.5	9.2	0
Ⅷ 3 〃	25.8	28.4	30.2	23.2	21.7	21.2	64.6	0
10 〃	27.3	31.1	33.0	23.5	21.8	0	66.9	0
17 〃	27.7	31.0	32.0	24.4	21.0	117.0	50.3	0
24 〃	26.7	29.6	31.6	23.9	21.8	33.3	41.8	0
31 〃	25.4	27.6	29.7	23.2	21.4	98.3	25.6	0
Ⅸ 7 〃	25.6	28.1	30.1	23.1	19.8	43.5	42.9	0
14 〃	26.3	28.5	29.4	24.1	23.1	63.3	25.5	0
21 〃	23.7	27.6	28.2	19.7	16.5	89.4	50.5	0
28 〃	22.7	26.1	29.8	19.3	15.9	49.2	32.9	0
Ⅹ 5 〃	18.0	21.5	25.0	14.4	10.4	53.0	17.9	0
12 〃	14.6	17.9	20.9	11.2	6.7	54.0	27.5	0
19 〃	17.3	20.8	23.1	13.7	10.8	20.8	32.2	0
26 〃	16.8	20.6	23.1	12.9	9.6	7.2	17.2	0
Ⅺ 2 〃	13.8	20.2	21.4	7.3	3.8	0	48.6	0
9 〃	14.0	20.1	21.0	7.8	6.8	43.0	49.1	0
16 〃	11.9	16.3	18.7	7.5	4.8	4.8	30.7	0
23 〃	12.9	16.4	18.8	9.3	3.1	91.1	25.9	0
30 〃	14.2	17.5	19.4	10.9	3.8	37.5	26.2	0
Ⅻ 7 〃	11.5	14.8	21.0	8.1	1.1	75.0	19.8	1
14 〃	9.1	13.1	16.5	5.0	0.4	0.2	32.1	1
21 〃	9.5	13.3	15.1	5.7	0.2	17.8	36.1	1
28 〃	6.6	11.8	13.7	1.4	−2.0	0	30.0	1
Ⅰ 4 1955	5.3	10.1	11.6	0.5	−3.0	1.8	38.8	3
11 〃	4.8	9.8	15.0	−0.2	−3.2	25.0	40.8	5
18 〃	6.9	10.4	13.8	3.4	0.8	0	42.7	0
25 〃	9.0	11.5	13.9	6.6	3.0	21.0	46.3	0
Ⅱ 1 〃	8.1	12.2	17.1	4.0	−1.2	17.6	40.6	1
8 〃	7.3	12.1	13.4	2.5	−1.2	2.5	24.1	1
15 〃	7.2	11.7	14.3	2.6	−1.9	0	45.9	0
22 〃	8.9	12.8	17.0	5.1	0.5	6.7	44.9	0
Ⅲ 1 〃	10.6	16.1	20.2	5.0	1.4	44.5	33.9	0
8 〃	8.1	11.6	17.5	4.7	1.1	86.2	21.5	0
15 〃	10.7	16.2	19.4	5.3	1.5	62.3	30.3	0
22 〃	12.4	16.0	18.3	8.8	6.3	63.2	26.9	0
29 〃	11.6	14.3	16.8	8.9	6.4	36.2	22.6	0

べて相当軽く葉身の先端の三分の一程度が乾燥状態を呈しているに過ぎなかつた．又其の後株の褐色に枯死する状態も遅れる傾向が見られた．そして2月中旬頃には上位の3葉位迄は再び緑色を呈し，3月初旬頃には更に緑色を増し小さな分蘖では全葉緑色のものもあつた．然し旧い大部分の分蘖では上位より第4葉以下の葉は既に完全に枯死していた．

尚草丈，分蘖数共に本年度に於ける之等の最高値は初年度に於ける最高値よりもかなり高くなつているが之は主として株の age が加わつた事によるものと思われる．

2. 地上部の収量

地上部の収量の時期的変化の状態を第2表に示した．

1）生葉重　6月下旬頃は葉身重，葉鞘重共に未だ極めて小さく且つ葉鞘重の葉身重に対する比が比較的大きい．従つて此の頃迄は葉鞘に比べて葉身の生育が劣つている事が注目される．其の後葉身重，葉鞘重共に次第に増大するが7月中旬頃迄はその増加は比較的緩慢である．然し8月初旬頃より9月下旬頃にかけては葉身重，葉鞘重共にその増加は最も大であり，一方葉鞘重と葉身重との比についてみるに7月中旬頃より9月下旬頃にかけて最も小さい事から此の頃は葉身，葉鞘共に生育は極めて旺盛であるが特に葉身の生育が旺盛である事が判る．

Table 2. Seasonal Variations in the Yield of Tops of Lemon-Grass per Clump

Date of harvest	Number of harvested clumps	Fresh weight							Leaf-sheaths / Leaf-blades	Whole leaves / Total stems
		Top	Leaves			Stems				
			Whole leaves	Leaf-blades	Leaf-sheaths	Total	New*	Old**		
		g	g	g	g	g	g	g		
Ⅵ 22 1954	8	216	81	32	48	126	—	—	1.7	0.7
Ⅶ 6 〃	8	266	123	51	71	132	—	—	1.4	0.9
20 〃	7	340	184	85	97	130	—	—	1.1	1.6
Ⅷ 10 〃	6	501	409	193	221	108	30	78	1.1	3.7
31 〃	6	1,221	1,002	440	554	168	81	87	1.3	6.3
Ⅸ 21 〃	6	2,503	2,140	945	1,170	221	168	53	1.2	9.7
Ⅹ 12 〃	6	2,945	2,574	1,155	1,400	269	213	56	1.2	9.7
Ⅺ 2 〃	6	2,357	2,044	877	1,151	252	203	48	1.3	8.5
23 〃	7	3,367	2,891	1,173	1,695	354	285	69	1.4	8.3
Ⅻ 14 〃	6	2,962	2,544	987	1,539	322	254	69	1.6	8.4
Ⅰ 4 1955	6	2,143	1,763	587	1,164	252	197	55	2.0	7.2
25 〃	7	2,024	1,593	414	1,168	371	283	89	3.2	4.3
Ⅱ 15 〃	6	1,572	1,213	270	933	313	250	62	3.5	3.9
Ⅲ 8 〃	6	1,418	1,074	239	839	320	262	58	3.9	3.5
29 〃	7	1,466	1,081	229	841	335	277	58	3.8	3.2

* Stems developed in the second year.

** Stems had developed in the first year.

其の後葉身重，葉鞘重共に増加はやや緩慢となり第2表では葉身重，葉鞘重，全葉重の何れも11月下旬に最高値が得られているが葉身重に於ては10月中旬のものと殆ど差はない．初年度に於ては之等三者の最高に達する時期は夫々10月中，下旬乃至11月初旬頃，11月中，下旬頃，及び11月初旬乃至下旬頃とみなされたが，本年度に於ても既述の草丈，分蘖数の増加の状態等からも考えて之等三者の最高に達する時期は初年度と殆ど変らない様に思われる．又其の後葉身重，葉鞘重共に減少の傾向を示し1月初旬頃より特に顕著に此の傾向が認められるが，此の冬季に於ける生葉重の減少は第3表に見られる様な低温による生葉の含水率特に葉身の含水率の低下によるものである事も疑ない事であるが此の事は初年度の場合と同様である．尚生葉の含水率については6月下旬に於ては葉鞘に於て比較的低く葉身との差が少い事，7月初旬に於ては葉身，葉鞘共にやや高い事，又1月初旬頃よりの葉鞘の含水率が本年度は初年度に比べてやや低い事等が認められるが，之等含水率の時期的変化の全般的な

傾向は初年度と殆ど同様である．尚既述の様に本年度は初年度に比べて葉の枯死程度が軽く葉身に於ても上位の3葉位迄は緑色を帯びていたが之等は含水率の測定には供試されなかつたので之等の影響は第3表の値には直接現われていない．

Table 3. Seasonal Variations in the Water Content of Fresh Leaves of Lemon-Grass.

Date of harvest			Whole leaves	Leal-blades	Leaf-sheaths
			%	%	%
Ⅵ	22	1954	79.11	77.06	80.37
Ⅶ	6	〃	85.11	80.36	88.88
	20	〃	81.78	77.70	84.77
Ⅷ	10	〃	80.01	76.23	82.40
	31	〃	80.60	75.69	83.19
Ⅸ	21	〃	82.81	75.57	86.58
Ⅹ	12	〃	82.26	77.53	85.03
Ⅺ	2	〃	77.56	75.11	78.99
	23	〃	77.41	74.01	77.81
Ⅻ	14	〃	75.21	73.63	76.03
Ⅰ	4	1995	71.34	64.04	74.13
	25	〃	58.52	12.33	67.54
Ⅱ	15	〃	53.89	11.36	61.81
Ⅲ	8	〃	57.89	12.18	65.81
	29	〃	63.41	13.33	70.75

2）生茎重　茎は前年度の旧茎と本年度新に形成された新茎とよりなり収穫の初期に於ては旧茎が大部分を占めているが両者の識別の困難なものもあつた．旧茎は枯死しているものが多い様で収穫時期の進むにつれて腐熟してその重量は次第に減少するが，新茎の重量は当然逆に次第に増大する事になる．そして初年度と同じく大体11月下旬頃から12月初旬頃にかけて最高に達するものの様である．其の後徐々に減少の傾向が見られるが生葉重の様に著しくなく之等新茎重の時期的変化についても初年度と大体同様の傾向が認められる．

3）全地上部生体重　収穫の初期に於ては旧茎重が比較的大きいので全葉重と全茎重との比は比較的小さいが生育の進むにつれて大きくなり後期には寒害による葉重の著しい減少により比率は再び低下する．従つて全地上部重は全葉重よりも収穫の初期に於てはその増加はやや緩慢であり又後期に於てはその低下が緩慢であるが大体に於て全葉重と似通つた時期的変化の状態を示している．又8月初旬頃よりの時期的変化の全般的な傾向は初年度と殆ど同様である．

以上の如く収穫を始めた6月下旬頃は地上部の生体重は各部共極めて小さく其の後気温の上昇に伴い生育が旺盛になるので各部の重量も亦漸次増大する事が認められるわけである．そして8月初旬頃よりの各部生体重の増加の状態や冬季に於ける寒害に基く各部生体重の減少の状態等地上部各部生体重の時期的変化の全般的な傾向は初年度と大体同様である事が認められるわけである．唯各部生体重自体については本年度は初年度に比べてかなり優つており，例えば全地上部重の最高値について比較すると本年度は初年度の約1.6倍になつている．之は既述の様に株のageが加つた為初年度に比べて草丈，分蘗数共に若干大になつているので当然の結果である．

3. 生葉の含油量

生葉の含油量の時期的変化の状態を第4表に示した．

1）含油率（vol/wt, %）6月下旬頃に於ては葉身，葉鞘夫々0.32%及び0.21%の最低値を示し全葉に於ても0.24%の最低値が得られているが特に葉身の含油率の著しく低い事が注目される．其の後葉身，葉鞘共に次第に上昇するが7月初旬頃は未だかなり低い値を示している．7月中旬には両者共相当高くなつているが葉身の含油率は其の後のものに比べて未だ若干低く従つて全葉に於ても未だやや低い値を示している．然し8月初旬には葉身，葉鞘共に極めて高い値が見られ，葉鞘並に全葉に於ては全期間の最高値が得られている．又此の頃より9

月下旬頃にかけては葉身，葉鞘夫々0.70%，0.35%前後，全葉に於ては0.50%前後の極めて高い値が見られる．其の後葉身，葉鞘共に徐々に低下の傾向が見られるが11月初旬頃迄は葉身，葉鞘，全葉夫々0.64～0.65%，0.30%，0.44～0.45%といつた相当高い値を示している．然し11月下旬頃からかなり低下の傾向を示し葉身に於ては12月中旬，葉鞘及び全葉に於ては何れも1月初旬に極めて低い値が得られている．其の後各部共含油率は再び上昇するが葉身に於て特に顕著である．

Table 4. Seasonal Variations in the Oil Content of Fresh Leaves of Lemon-Grass

Date of harvest	Number of distilled clumps		Oil content (vol/wt)				Total yield of oil per clump			
	Whole leaves	Leaf-blades and Leaf-sheaths	Whole $\overline{\omega}_1$*	leaves $\overline{\omega}_2$**	Leaf-blades	Leaf-sheaths	Whole $\overline{W}_1$*	leaves $\overline{W}_2$***	Leaf-blades $\overline{B}$	Leaf-sheaths $\overline{S}$
			%	%	%	%	cc	cc	cc	cc
VI 22 1954	4	4	0.24	—	0.32	0.21	0.060	0.096	0.080	0.052
VII 6 〃	4	4	0.36	—	0.47	0.23	0.271	0.416	0.265	0.195
20 〃	3	4	0.42	—	0.59	0.30	0.827	0.680	0.467	0.273
VIII 10 〃	3	3	0.55	0.54	0.70	0.38	2.296	2.228	1.341	0.819
31 〃	3	3	0.50	0.51	0.73	0.34	5.274	5.041	3.036	1.772
IX 21 〃	3	3	0.49	0.49	0.68	0.32	9.190	10.291	7.167	4.224
X 12 〃	3	3	0.44	0.45	0.65	0.30	12.477	11.504	6.740	3.790
XI 2 〃	3	3	0.44	0.44	0.64	0.30	8.306	8.817	5.722	3.606
23 〃	3	4	0.37	0.39	0.62	0.26	9.873	11.143	7.539	4.558
XII 14 〃	3	3	0.36	0.38	0.61	0.27	8.462	9.586	6.361	4.350
I 4 1955	3	3	0.35	0.36	0.65	0.23	6.615	6.323	3.558	2.471
25 〃	4	3	0.39	0.40	0.90	0.25	4.976	6.294	3.805	3.118
II 15 〃	3	3	0.41	0.42	1.01	0.27	5.138	5.116	2.652	2.443
III 8 〃	3	3	0.37	0.39	1.00	0.26	4.457	4.226	1.972	2.023
29 〃	4	3	0.32	0.34	0.81	0.25	3.133	3.712	2.149	2.335

* Values determined by the distillation of whole leaves.

$$\Sigma\omega_1+\Sigma\frac{B+S}{\text{Fresh weight of whole leaves}}\ (\%)$$

** $\dfrac{\qquad}{\text{Number of total harvested clumps}}$

*** $\dfrac{\Sigma W_1+\Sigma\,(B+S)}{\text{Number of total harvested clumps}}$

以上の如く6月下旬頃より7月初旬頃迄の含油率については葉身，葉鞘共に未だ極めて低い事が注目されるのであるが8月初旬頃には何れも著しく上昇し，此の頃よりの含油率の時期的変化については初年度と大体似通つた傾向が認められるわけである．唯初年度に於ては1月初旬には葉身の含油率の急激な上昇が認められたのであるが本年度に於ては上昇の程度は左程顕著でなく同月下旬に於て顕著な上昇が認められており又其の後の葉身の含油率は初年度に比べるとかなり低い傾向が認められるが，之等は主として既述の様に葉の枯死程度が本年度は初年度に比べてやや軽かつた為であろうと考えられる．尚8月初旬頃より12月中旬頃迄の含油率自体については本年度は初年度に比べて葉身，葉鞘共にかなり高い事が認められる．

2）1株当全収油量　6月下旬頃は葉身，葉鞘共にその生体重が大なる上に之等の含油率も極めて低いので1株当全収油量は両部共極めて少いのは当然である．そして7月中旬頃迄は生葉重の増加は比較的少い上に含油率も未だかなり低いので各部の全収油量の増加も亦比較的少い．然し其の後8月初旬頃から9月下旬頃にかけては生葉重の増加が極めて大であるばかりでなく含油率も最も高い時期であるので各部の全収油量の増加も最も大である．其の後葉身，葉鞘共に生体重の増加はやや緩慢となる一方之等の含油率も亦若干低下の傾向を示すので全収油量の増加も次第に緩慢になる．そして第4表では全葉の全収油量は10月中旬に最高値が得られ其の後次第に低下の傾向を示している．既述の様に全生葉重は11月下旬に最高値が得られているが此の頃には葉身，葉鞘共に含

油率はかなり低下しているので全収油量に於ては既に最高の時期を過ぎて若干低下している事が明かに認められるわけである．又葉身の全収油量の最高に達する時期は葉鞘のそれよりも早く夫々大体10月中旬より11月初旬頃及び11月初旬より下旬頃でないかと思われる．そして12月中旬頃になると葉身，葉鞘共に生体重が減少するのみならず含油率もかなり低下しているので全収油量に於ては各部共減少の傾向が次第に顕著に認められる．其の後1月初旬乃至下旬頃より葉身，葉鞘共に含油率が上昇しているが之は葉の含水率の低下によるものである事は全収油量は逆に引続き減少している事によつて明かであり此の傾向は初年度に於けると同様である．

以上の如く6月下旬頃より7月初，中旬頃迄は葉身，葉鞘共に全収油量は極めて少く且つ之等の増加も緩慢である事が注目されるのであるが，其の後8月初旬頃よりの各部の全収油量の増加の状態，之等の最高に達する時期更に其の後の減少の状態等全収油量の時期的変化の全般的な傾向は初年度の場合と大体同様である事が認められるわけである．唯葉身，葉鞘共に之等の全収油量は初年度のものに比べて相当大であるが，之は既述の様に本年度は初年度に比べて生葉重が大なる上に含油率も全般的に高いので当然の事である．

4．油のチトラール含量

油のチトラール含量の時期的変化の状態を第5表に示した．6月下旬に於ては葉身，葉鞘の別にはチトラール含量の定量は行い得なかつたが全葉に於ては極めて低い値が得られている．其の後葉身葉鞘共に徐々に上昇の傾向が見られるが7月初旬に於ては未だ相当低い値が得られており同月中旬になると葉鞘では相当高くなつているが葉身では未だかなり低い値が得られている．其の後葉身に於ては8月初旬頃には相当上昇し70％近い値が見られ同月下旬頃より12月中旬頃迄は常に70～71％台の値を示しており此の期間に於ては一定の時期的変化の傾向は殆ど認められない．1月初旬頃から大体70％を僅かに下廻る値を示しやや低下の傾向が見られるが，全般的に葉身に於てはチトラール含量の時期的変化は比較的少くこの事は初年度の場合と同様である．

Table 5. Seasonal Variations in the Citral Content of Lemon-Grass Oil.

Date of harvest	Whole leaves	Leaf-blades	Leaf-sheaths
	%	%	%
Ⅵ 22 1954	66.1	—	—
Ⅶ 6 〃	67.9	67.1	70.5
20 〃	69.7	65.5	73.8
Ⅷ 10 〃	70.9	69.6	74.3
31 〃	71.6	70.3	73.6
Ⅸ 21 〃	73.7	71.6	76.2
Ⅹ 12 〃	72.0	70.7	74.2
Ⅺ 2 〃	71.7	71.1	71.6
23 〃	71.3	71.4	70.4
Ⅻ 14 〃	70.7	71.8	70.3
Ⅰ 4 1955	68.4	69.5	65.8
25 〃	69.2	68.1	66.5
Ⅱ 15 〃	69.4	70.2	69.3
Ⅲ 8 〃	68.6	69.6	66.6
29 〃	66.4	67.5	68.2

葉鞘に於ては7月中旬頃より10月中旬頃迄は大体に於て73～74％台の値が得られ時には76％台の最も高い値が得られているが，11月初旬頃には既に若干低下の傾向が見られる．其の後次第に低下し1月初旬頃より更に著しく低下の傾向が見られる．以上の如く葉鞘に於てはチトラール含量の時期的変化が顕著に認められ最高値と最低値との間には10％近い差が見られるが此の様な傾向も初年度の場合と殆ど同様である．

全葉のチトラール含量の時期的変化は既述の葉身と葉鞘のチトラール含量の時期的変化の傾向より大体推定出来る事であるが直接定量した値についてみると次の様である．6月下旬に於ては66％台の最低値が見られるが其

の後上昇し7月中旬頃には70% 近い値を示している．そして8月中旬頃から11月初旬頃迄は大体72～73% 前後の最も高い値を示し其の後僅かに低下の傾向が見られる様であるが，8月初旬頃より12月中旬頃迄は最低71%近い値を示しており此の期間に於ける時期的変化は比較的少い．之は此の期間に於ては葉鞘に比べて葉身の油量が遥かに大きく全葉に於けるチトラール含量は葉身の油量によつて大きく左右されるからである．然し1月初旬頃より葉鞘のみならず葉身のチトラール含量もやや低下するので全葉に於ても当然かなり低下する事になる．

尚葉身と葉鞘のチトラール含量を比較すると葉身，葉鞘の別に定量を始めた7月初旬より10月中旬頃迄は葉鞘は葉身よりも常に相当高いが，11月初旬頃になると葉鞘のチトラール含量はかなり低下するので此の頃には両者の差は殆ど無くなり同月下旬頃からは逆に葉鞘は葉身に比べてやや低くなつているがこの様な傾向も初年度の場合と殆ど同様である．

以上の如くチトラール含量に於ても6月下旬頃は極めて低い事が注目されるが其の後葉身，葉鞘共に次第に上昇し8月初旬頃よりの各部の時期的変化の全般的な傾向については初年度の場合と殆ど同様である事が認められるわけである．又各部のチトラール含量自体についても両年度間に一定の差異は見られない様である．

5.　油の比重並に屈折率

油の比重並に屈折率の時期的変化の状態を第6表に示した．夫々8月31日及び7月20日よりの値であるが何れも葉鞘は葉身に較らべて遥かに大であり，又全般的に生育の進むにつれて之等の値は何れも増大し1月初旬頃から一層増大する傾向が認められる．即ち比重，屈折率共に之等の時期的変化の全般的な傾向については初年度の場合と殆ど同様である．唯屈折率に於ては本年度は初年度に比べて葉身，葉鞘共にやや高い傾向が認められる．

Table 6. Seasonal Variations in the Specific Gravity and Reflactive Index of Lemon-Grass Oil.

Date of harvest			Specific gravity, d_{25}^{25}			Reflactive index, n_{25}^{D}		
			Whole leaves	Leaf-blades	Leaf-sheaths	Whole leaves	Leaf-blades	Leaf-sheaths
Ⅵ	22	1954	—	—	—	—	—	—
Ⅶ	6	〃	—	—	—	—	—	—
	20	〃	—	—	—	1.4830	1.4812	1.4842
Ⅷ	10	〃	—	—	—	1.4827	1.4829	1.4850
	31	〃	0.8763	0.8753	0.8847	1.4830	1.4829	1.4842
Ⅸ	21	〃	0.8760	0.8737	0.8825	1.4840	1.4830	1.4851
Ⅹ	12	〃	0.8753	0.8724	0.8827	1.4849	1.4840	1.4861
Ⅺ	2	〃	0.8770	0.8749	0.8851	1.4842	1.4840	1.4874
	23	〃	0.8776	0.8758	0.8862	1.4840	1.4839	1.4860
Ⅻ	14	〃	0.8775	0.8737	0.8841	1.4841	1.4839	1.4860
Ⅰ	4	1955	0.8775	0.8775	0.8862	1.4850	1.4849	1.4868
	25	〃	0.8794	0.8767	0.8866	1.4840	1.4838	1.4864
Ⅱ	15	〃	0.8814	0.8772	0.8879	1.4852	1.4841	1.4870
Ⅲ	8	〃	0.8808	0.8766	0.8879	1.4870	1.4859	1.4889
	29	〃	0.8835	0.8790	0.8872	1.4861	1.4861	1.4880

6.　油の色

収穫初期のものは油の色は淡黄色で植物の生育の進むにつれて黄色が濃くなり特に1月初，中旬頃より葉の枯死状態が進むにつれて黄色の強くなる事，又葉鞘は葉身に比べて著しく色の淡い事等油の色の時期的変化についても初年度の場合と大体同様の傾向が認められる．

考　　察

レモングラスの枯死温度について Hood[3]（1917）は冬季の温度が28°F（−2.2°C）で地上部が枯死し24°F（−4.4°C）で根部が枯死すると述べている．又同時に25°F（−3.9°C）以下に下らない所では栽植は安全であり

条件によつては之より僅かに低い温度の下でも大した被害を起さないと述べている．著者等[5]（1955)が第1報で報じた様に当場での従来の試作に於て冬季の最低気温は－4～－5°C程度に低下し地上部は大体枯死するけれども地下部迄枯死する場合は殆ど見られなかつたのであり，本実験に於ても冬季の最低気温はのこ程度に数回低下しているが越冬不能の株は全然見られなかつたわけである．低温の植物に及ぼす影響はその加わり方の緩急や持続期間或は土壌水分等各種の条件によつて異る事は当然考えられるのであるが，本実験の結果や従来の試作の結果からすればHoodの述べている28°F或は24°F程度に気温が数回低下してもその為に地上部或は地下部が常に全面的に枯死するとは考えられない．然し実際栽培に於ては本植物の枯死温度の限界を此の程度にみておく方が安全であり，又彼が25°F以下に下らない所では栽植が安全であるといつている事も妥当の様に思われる．

植物の生育についてみるに4，5月頃に於ては極めて緩慢である事が注目されたが其の後の生育状態は初年度の場合と殆ど同様であつて7，8，9月頃の高温の時期に生育は最も旺盛で10月初旬頃には再び緩慢になる事が認められたわけである．従つて植物の生育は高温の下で旺盛で気温が低下すれば緩慢になる事は確かである．唯植物の生育が或る程度進めば其の後の生育は比較的緩慢になる事は当然考えられるので10月初旬頃より生育の緩慢になる事の原因を気温の低下にのみ帰する事は妥当でないかも知れない．然し一方気温についてみると10月初旬より下旬頃迄は平均14～18°C台，最高平均17～21°C台，最高絶対20～25°C台，最低平均11～14°C台，最低絶対6～10°C台の値を示しており，之等は大体に於て4月下旬乃至5月初旬頃より6月初，中旬頃迄の気温に近い値であり且つ6月初，中旬頃迄は生育が比較的緩慢である事から10月初旬頃よりの生育の低下も気温の低下が最も大きな原因になつている事は間違ない様に思われる．次に11月初旬頃より12月初旬頃にかけては本年度は昨年度より気温はやや高いけれども11月中，下旬頃になると昨年度と同じく生育は既に殆ど停止しており，一方11月中，下旬頃の気温についてみると平均11～14°C台，最高平均16～20°C台，最高絶対18～21°C台，又此の頃の生育に最も重要な影響を及ぼすと考えられる最低気温は均平7～10°C台，絶対3～6°C台となつている．生育の停止する温度は株のageや其の他栽培条件等によつて異るであろうから厳密に決定する事は困難であるが第1報に於て最低平均5～10°C，最低絶対0～5°C附近になると生育は大体停止するものと推定した事は本年度の結果から考えても大きな間違はない様に思われる．次に生育に大きな影響を及ぼす気象条件として降雨量が考えられ第1報で述べた様に世界の主なレモングラスの栽培地に於ては生育に最も重要な影響を及ぼす気象条件として降雨量が第一に挙げられている．降雨量は土壌水分と極めて密接な関係があるので著者等[4]（1955）は土壌水分とレモングラスの生育或は含油量，チトラール含量等との関係について研究を行つた結果特に過湿状態でない限り土壌水分の相当多い場合に生育は良好で土壌水分の低下に伴つて生育の劣る事が認められている．所で本年度は7月中，下旬頃から8月初旬頃にかけての約1ヶ月間は月雨量30mm前後に過ぎず昨年或は一昨年に比べて遙かに少い事が注目される．又圃場は地下水位低く排水良好であるので此の頃は土壌は相当乾燥しており生育はかなり阻害されていると思われるのであるがそれでも他の時期と比べると生育の劣る傾向はなく寧ろ此の頃は生育の最も旺盛な時期である．そして此の頃より9月下旬頃迄の高温の時期を除いては降雨量は潤沢にあつても生育は之等高温の時期と比べると遙かに劣つている．従つて大体に於て生育に最も大な影響を及ぼす気象条件は気温であつて気温の高い事が生育を旺盛ならしめる第一の条件であると考えてよい様である．

生葉の含油率の時期的変化の原因については著者等[5]（1955）は第1報に於て初年度の秋から冬にかけての含油率の低下の主な原因は気温の低下によるものでないかと推定したのであるが，その時にも述べた様に含油率の変化は之等気象要素等を含めた栽培条件の変化による事と，植物自体の生育過程に伴う必然的な生理化学的変化による事とが考えられる．後者に関してGuenther[2]（1950）は含油率は若い葉に於て高く旧い葉では低下すると云つており，かかる点からいえば本年度収穫を始めた6月下旬頃は生育の初期であり葉のageは比較的若いので含油率は相当高い事が予想されるのであるが本実験の結果によれば逆に最も低い値が得られている．葉のageと含油率との関係については尚詳細な研究によらなければ正確な事は云えないのであるが，6月下旬頃の含油率が此の様に著しく低いのは葉の発生し始めた4月頃より此の頃迄の気温が比較的低い事が最も大な原因でないかと想像される．尚6月下旬頃は梅雨期の始めであつて第1表によれば雨量は左程多くはないが日照時間は相当少い事が注目される．日照不足が含油率を低下させる事については Arrillaga等[1]（1943）の研究がある外Serre[6]（1905），Squibbs[7]（1937）もこの事を報じている．従つてこの日照時間の少い事も此の頃の含油率の低下の原因の一つになつているのではないかと考えられるが，其の後7月初旬頃にかけて日照時間は益々短くなつているが気温

は引続き上昇し且つ含油率の上昇している事から，此の頃に於て含油率に最も大きな影響を与える気象条件は気温であつて多少の日照不足があつても気温の上昇に伴つて含油率は上昇するものの様に思われる．次で8月初旬頃より下旬頃にかけて含油率は最も高い傾向が見られるが之は此の頃の気温が極めて高い事が最も大な原因であつて更に日照時間の極めて豊富であつた事も亦一つの原因になつているのではないかと想像される．尚又此の頃は高温の為生育は最も旺盛で新葉の発生の最も多い時期であるので葉の age も比較的若い事になるのでかかる事も必然的に含油率を高める事になつたのではないかと思われる．逆に秋より冬にかけては気温の低下に伴い生育が緩慢になるので葉の age は一層旧くなるのでかかる点からも含油率の低下する事が考えられるのであるが，此の頃の含油率の低下の最も直接的な原因は矢張り第1報で述べたと同じく気温の低下でないかと思われる．尚1月初旬乃至下旬頃に於て全収油量は引続き減少しているにも拘らず生葉の含油率は特に葉身に於て著しく上昇しているが之は寒害による生葉の含水率の急激な低下に基く事は初年度の場合と同様である．以上の事から生葉の含油率の時期的変化に最も大な影響を与えるのも気温の変化であつて高温は含油率を高めるが逆に低温は含油率を低下せしめるものと考えてよい様である．次に8月初旬頃よりの含油率は葉身，葉鞘共に本年度は初年度に比べてかなり高い事については両年度に於ける気温，日照等の気象条件の差異による事や植物の age の差異による事等が考えられるが之等の点については尚更に研究を要する．

油のチトラール含量も含油率の場合と同じく植物自体の生育過程に伴う必然的な生理化学的変化と気象要素等の栽培条件の変化によつて影響される事が考えられ，前者に関しては Arrillaga等[1] (1943)，Serre[6] (1905) は日照不足がチトラール含量を低下させる事を報じ，Hood[3] (1917) は土壌の過湿がチトラール含量を低下させる事を述べているがこの事は著者等[4] (1955) の研究に於ても認められている．所で著者等[5] (1955) は初年度に於ける秋より冬にかけてのチトラール含量の低下は含油率の場合と同じく主として気温の低下によるものでないかと推定したが，本年度に於ては6月下旬に於けるチトラール含量は含油率の場合と同じく最も低い値を示しており此の頃は既述の様に葉の age も比較的若く梅雨期の日照不足もあるので之等の事も或る程度その原因になつている事が考えられるけどれも，其の後7月初旬頃迄顕著な日照不足があるにも拘らずチトラール含量も含油率と同じく大体に於て葉身，葉鞘共に上昇の傾向を示している事から，6月下旬頃のチトラール含量の極めて低い事も矢張り4月頃から6月頃迄の気温が比較的低い事が最も大きな原因になつていて其の後気温の上昇と共にチトラール含量も上昇したものと考えてよい様に思われる．葉の age とチトラール含量との関係についても尚詳細な研究を必要とするのであるが旧い葉は若い葉に比べてチトラール含量が高い傾向があるとすれば秋より冬にかけては生育は緩慢になるので葉の age は一層旧くなる故，かかる点から考えると此の頃チトラール含量が低下するのは不合理の様に思われるが本年度も初年度と同じく低下の傾向が見られたわけで此の事からも此の頃のチトラール含量の低下は矢張り気温の低下が最も大きな原因になつているのではないかと想像される．結局チトラール含量の時期的変化に於ても葉の age や日照等が或る程度その原因になつている事が考えられるがその最も大きな原因は気温の変化であつてチトラール含量も含油率の場合と同じく高温の下では高く気温の低下はチトラール含量を低下させるものと考えてよい様に思われる．尚チトラール含量に於ては両年度間に一定の差異が認められないので両年度間の気象条件の差異や植物の age の差異もチトラール含量にはそれ程著しい影響を及ぼす事はない様に思われる．

以上の如くレモングラスの実際栽培上最も重要性のある生育，含油量並にチトラール含量の時期的変化についてみるに之等に最も大な影響を及ぼすのは気温の変化であつて，高温は植物の生育を旺盛ならしめる許りでなく含油量，チトラール含量を共に高めるが，逆に低温は生育を抑制する許りでなく含油量，チトラール含量を共に低下させる傾向が認められるので此の事はレモングラスの栽培上極めて注意すべき事と考えられる．

油の比重，屈折率の時期的変化については大体に於て初年度と同じく植物の生育の進むにつれて之等の値の増大している事から，葉の age の加わるにつれて比重，屈折率共に増大するのではないかと思われる．気象条件の影響については寒害による茎の枯死がみられる頃より比重，屈折率共に若干増大する様であるが此の頃迄の気象条件の影響については余り明かでない．尚屈折率に於て本年度は昨年度に比べて葉身，葉鞘共にやや高い傾向が認められるが之は両年度間の気象条件の差異や植物の age の差異による事や更に又第1報で述べた様な蒸溜条件の差異による事等が考えられるが之等の点については尚更に研究を要する．

摘　　要

1 ） 初年度より2年度にかけて圃場に残存した株は冬季地上部は大部分枯死したが全株越冬した．然し2年度に於ける植物の生育は6月初旬乃至中旬頃迄は比較的緩慢であつた．従つて収穫を始めた6月下旬に於ては収草量は極めて少く更に含油率も葉身，葉鞘共に極めて低く且つ油のチトラール含量も亦極めて低かつた．之は主として6月頃迄の気温が比較的低い事によるものと思われる．

2 ） 其の後気温の上昇と共に生育は旺盛となり収草量が増大するのみならず含油率，チトラール含量共に徐々に上昇する．然し7月中旬頃迄は収草量のみならず含油率，チトラール含量共に未だかなり低かつた．

3 ） 8月初旬頃より9月下旬頃にかけて初年度の場合と同じく収草量の増加は最も大きく且つ含油率も葉身，葉鞘共に最も高いので全収油量の増加も極めて大であり，更にチトラール含量も最も高い傾向が見られた．之等の事は主として此の頃の気温の高い事によるものと思われる．

4 ） 其の後の収草量，含油率並にチトラール含量の時期的変化については大体に於て初年度と似通つた傾向が認められたが，8月初旬頃より寒害が顕著に現われ始める1月初旬頃迄は収草量，含油率共に本年度は初年度に較べてやや高い傾向が見られた．

5 ） 以上の結果よりレモングラスの生育，含油量並びにチトラール含量の時期的変化に最も大きな影響を与えるのは気温の変化であつて，高温は生育を旺盛ならしめる許りでなく含油量並びにチトラール含量を高めるが，逆に気温の低下は生育を緩慢ならしめる許りでなく含油量並びにチトラール含量を低下せしめる傾向がめ認られる．

6 ） 油の比重，屈折率，並びに油の色に関しては大体に於て初年度と似通つた傾向が認められた．

文　　献

1 ） Arrillaga, N. G. and Villamil, A. R. : *Amer. Perfvmer and Essential Oil Rev.*, 45 (11) : 29−31 (1943).

2 ） Guenther, E. : The Essential Oils, Vol IV, D. Van Nostrand, New York, P. 20−65, 1950.

3 ） Hood, S. C. : *U. S. Dept. Agr. Bull.*, 442 : 1−12 (1917).

4 ） 宮崎幸男，高城正勝：衛試報，73 : 277−287 (1955).

5 ） 宮崎幸男，高城正勝：衛試報，73 : 289−303 (1955).

6 ） Serre, P. : *Agr. Prat. du Pays Chauds*, 5 (30) : 255−258 (1905). Through *Puerto Rico Fed. Expt. Sta. Bull.* No. 50 (1950).

7 ） *Seychelles Dept. Agr. Ann. Rpt.*, 1936 : 10−28 (1937), *Through Puerto Rico Fed. Expt. Sta. Bull.* No. 50 (1950).

Summary

1 ） All clumps left in the field at the end of the first year remained alive over the winter in spite of a great deal of damage to the tops of the plants. But the growth of the plants in the second year was relatively slow till the beginning or the middle of June. Consequently, at the end of June when harvesting was begun, the yield of grass was very small. Moreover, the percentage of oil content was very low either in leaf-blades or in leaf-sheaths, and the citral content of oil also showed a very low percentage. These facts seem to be brought about by the relatively lower temperature till June.

2 ） Thereafter, with the rapid growth due to the ascent in the temperature, the yield of grass became higher, and both the percentage of oil and that of citral also gradually increased. However, till about the middle of July, not only the grass yield but also the percentages of oil and citral, were still relatively low.

3 ） During the period from the beginning of August to the end of September, the maximum increase in the yield of grass was obtained, which had been seen also during this period in the preceding first year crop, and the percentage of oil content was highest both in leaf-blades and in leaf-sheaths, resulting in a progressive increase in the total yield of oil per clump. Moreover, the citral content tended

to be highest during this period. These facts seem to be brought about chiefly by the high temperature during this period.

4) As to later seasonal variations in the yield of grass, oil content, and citral content, a similar tendency to that in the first year was recognized in general, though during the period from the beginning of August to the beginning of January when remarkable cold injuries began to be recognized, both the yield of grass and the percentage of oil content were somewhat higher than those in the first year.

5) From the results mentioned above, it is found that seasonal variations in the growth, oil content, and citral content of lemon-grass seem to depend chiefly upon variations in temperature; namely, with the ascent in temperature, not only the growth becomes rapid, but also both the oil content and citral content become higher, on the other hand, with the descent in temperature not only the growth becomes slow, but also both the oil content and citral content become lower.

6) As to seasonal variations in the specific gravity, reflactive index, and colour of oil, a similar tendency to that in the first year was also recognized in general.

Received June 18, 1957.

土壤水分がゼラニウム（*Pelargonium denticulatum* JACQ.）の生育並に含油量に及ぼす影響*

宮 崎 幸 男

The Effect of the Soil Moisture upon the Growth and Oil Content of Geranium (*Pelargonium denticulatum* JACQ.)

Yukio MIYAZAKI

緒　　言

Guenther[1] (1950) は世界の主なゼラニウム油の産地に於けるゼラニウムの栽培状態について述べている中で，ゼラニウムの生育には相当水分を要する事，乾燥や過湿が生育を阻害する事，又雨量や灌漑等によりその生育や収油量が著しく影響を受ける事等を指摘している．Sievers等[4] (1931—1932)もアメリカに於けるゼラニウムの栽培試験に於て灌漑が極めて重要な役割を演ずる事を報じている．之等灌漑や雨量の影響は主として之等灌漑や雨量に伴う土壤水分の影響とみなしてよいと思われるが，直接土壤水分とゼラニウムの生育乃至含油量等との関係について行われた研究は未だ見られない様であるので著者は此の問題を明かにする目的を以て本研究を行つた．

材料及び方法

材　料　供試植物の種類は *Pelargonium denticulatum* JACQ. で昭和30年3月18日に温室にて栽培中のものの茎を先端より9 cm にて切取り上位より展開葉5枚を残して下位の葉を切除し5 cm の深さに砂土に挿して温室内で活着を図り，5月2日に之等の中から均等な苗を撰んで定植した．定植時の苗の重量は大体 20g 前後であつた．

方　法　内径約21cm，深さ約20cmの磁製ポットを使用し底に含水率1. 60％の風乾砂600gを敷きその上に含水率3. 87％の風乾土5. 7kgを入れ，ポットの内壁に沿つて内径約 1. 8cm，長さ約20cm の硝子管を2本立てその下端が底砂に接する様にして給水管とした．

肥料はポット当N，P_2O_5，K_2O各 0. 5gとし夫々硫安，過燐酸石灰，硫酸加里を用い，又炭酸石灰5g宛加用し何れも全土とよく混和した．

土壤水分の区別は容水量の 95％，75％，55％，35％，及び25％の5区とした．土壤並に砂の容水量は夫々57. 33％及び31. 23％で各区の土壤水分は之等土壤並に砂の容水量に対する％の和である．供試個体数は各区共6個体とした．

定植後直ちに土壤面より2 *l* 宛灌水して日蔭に置き其の後徐々に日光に当てて苗の活着を図つた．ポットは終始硝子室内に置き5月9日より重量法によつて土壤水分の調節を開始したが35％及び25％の両区は未だ水分多く前者は5月18日後者は5月27日より所定の量に調節可能となつた．其の後調節は毎日数回行い水は総て井戸水を用いた．生育に伴う植物重の増加に対する土壤水分の補正は行わなかつた．

実験期間中の硝子室内の温度は最高平均28. 6°C，最低平均19. 1°C，平均23. 9°Cであつた．

5月9日より主茎の長さ及び生葉数等の調査を行うと共に6月27〜28日に収穫を行い地上部並に地下部の各部の収量を調査した．

成葉の特徴として収穫直後主茎の上位より数えて全節の $\frac{1}{3}$ に当る節と隣接する上下2節の葉計3葉を供試して葉柄長，葉片長，葉片幅を測定する外，上位より $\frac{1}{3}$ に当る節と隣接する上位の節の2葉を供試して生葉の含水率を求めた．

上記生葉の含水率の測定に供試した残りの葉を一昼夜室内に放置し稍々乾燥させた後全部蒸溜し，又其の後茎

* 本報告は昭和31年12月15日日本作物学会第113回講演会に於て発表された．

は各区共全個体を合計し 3 mm 前後に輪切にして蒸溜し夫々生葉並に生茎の含油量を求めた．精油定量器は局方のそれに準じたものであるが目盛の部は内茎 4 mm，1 目盛の読み0.02cc のものを使用し蒸溜時間は溜出開始より葉では1.5時間，茎では 3 時間とした．

油の比重は供試油量の多少により 1 cc 或は 2 cc のオストワルド比重瓶により，又屈折率はアッベ屈折計により何れも 7 月 1 日に測定した．

実験結果

1. 実験期間中の土壌水分の変化

水分調節を始めた 5 月 9 日より収穫直前の 6 月 26 日迄の 1 週間毎に計算した給水量を第 1 表に示した．全期間に於ける総給水量並に 1 回当給水量は何れも55%区最大で 75%，35%，95%，及び 25%の各区の順に低下している．1 回当給水量は初期に於ては大なる区でも容水量の 1 % 前後に過ぎないが大体に於て植物の生育の進むにつれて増大し最大の55%区では収穫前の 1 週間に於ては2.4%に達している．次に植物重の増加に対する水分の補正を行わなかつたので生育の進むにつれて給水を完了した時でも所定の土壌水分含量よりも次第に低くなる事になる．収穫時に於ける各区の植物重は夫々容水量の 3.5%，7.6%，8.4%，7.1% 及び 3.5% に相当しており，又収

Table 1.　Amount of Water Supplied in the Course of Soil Moisture Adjustment

		May9—May15					May16—May22				
		95%	75%	55%	35%	25%	95%	75%	55%	35%	25%
Number of times of water supplyment		20	20	16	0	0	32	32	32	25	0
Total amount of water supplied (g)		709	711	516	0	0	916	1,017	888	429	0
Amount of water supplied per once	g	35.5	35.6	32.3	0	0	28.6	31.8	27.8	17.2	0
	% of water capacity	1.1	1.1	1.0	0	0	0.9	1.0	0.8	0.5	0
		May23—May29					May30—Jun. 5				
		95%	75%	55%	35%	25%	95%	75%	55%	35%	25%
Number of times of water supplyment		35	35	35	34	19	26	26	26	25	19
Total amount of water supplied (g)		1,342	1,536	1,432	1,001	255	916	1,141	1,237	1,026	500
Amount of water supplied per once	g	38.3	43.9	40.9	29.4	13.4	35.2	43.9	47.6	41.0	26.3
	% of water capacity	1.1	1.3	1.2	0.9	0.4	1.1	1.3	1.4	1.2	0.8
		Jun. 6—Jun. 12					Jun. 13—Jun. 19				
		95%	75%	55%	35%	25%	95%	75%	55%	35%	25%
Number of times of water supplyment		27	30	30	30	27	24	39	39	39	24
Total amount of water supplied (g)		1,123	1,599	1,971	1,744	778	1,460	2,283	2,838	2,424	1,049
Amount of water supplied per once	g	41.6	52.3	65.7	58.1	28.8	60.8	58.5	72.8	62.2	43.7
	% of water capacity	1.2	1.6	2.0	1.7	0.9	1.8	1.8	2.2	1.9	1.3
		Jun. 20—Jun. 26					Whole period				
		95%	75%	55%	35%	25%	95%	75%	55%	35%	25%
Number of times of water supplyment		42	51	51	51	30	206	233	229	204	119
Total amount of water supplied (g)		2,138	3,616	4,067	3,191	1,558	8,604	11,903	12,949	9,815	4,140
Amount of water supplieb per once	g	50.9	70.9	79.7	62.6	51.9	41.8	51.1	56.5	48.1	34.8
	% of capacity	1.5	2.1	2.4	1.9	1.6	1.3	1.5	1.7	1.4	1.0

穫前1週間の1回当給水量は夫々1.5%，2.1%，2.4%，1.9%，及び1.6%となつているので此の頃に於ける給水直前の土壌水分は所定の量より夫々5.0%，9.7%，10.8%，9.0%，及び5.1%低くなつている事になる．従つて実験の初期より後期に至る迄の各区の 土壌水分の変化の範囲は夫々 大体次の如くであつたと考えられる．95～90% 75～66%，55～44%，35～26%，及び25～20%．

2. 地上部の生育過程

主茎の伸長状態と主茎の生葉数の増加の状態を 第1図並に第2図に示した， 先ず主茎長についてみるに生育の初期に於ては75%，55%，及び35%の3区間の差は殆んど見られないが中期より 55%区は他の2区よりも稍々大

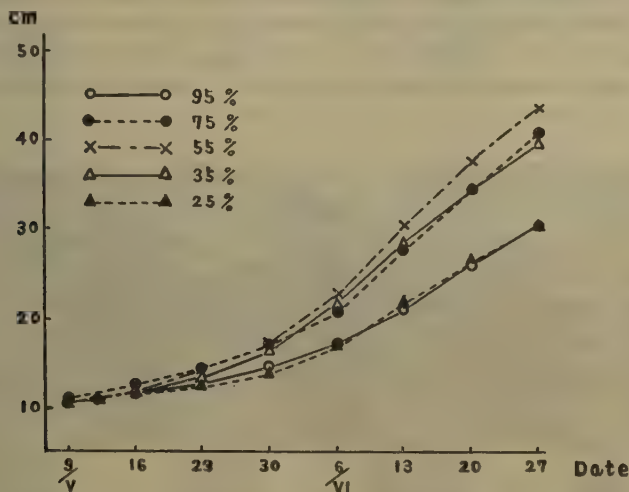



Fig. 1. Comparison of the Height of the Main Stem of Geranium among Different Treatments

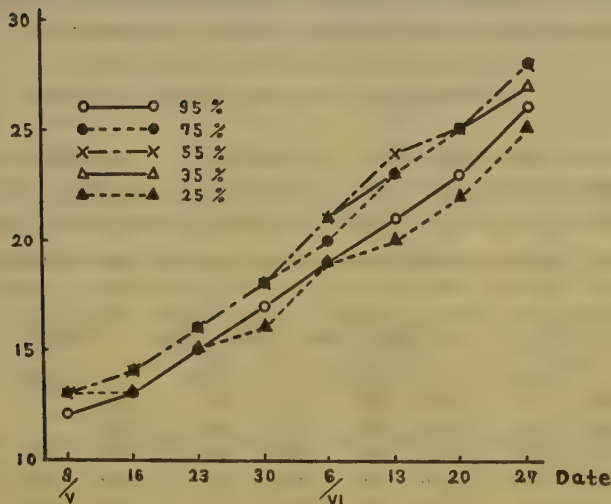



Fig. 2. Comparison of the Number of Alive Leaves of the Main Stem of Geranium among Different Treatments

になる傾向が見られる．75%区と35%区の両区間の差は殆んど見られない．95%と25%の両区は比較的初期より他区に比べてかなり劣り且つ両区間の差異は殆んど認られない．次に主茎の生葉数に於ても75%，55%，35%の3区は95%及び25%の両区に比べて稍々多く且つ之等3区間の差は殆んど認められない．又25%区は95%区よりも僅かに劣り全区間中最も少い．側枝の発育状態は生育の途中に於ては調査しなかつたが75%，55%，35%の3区は95%及び25%の両区に比べて著しく優り55%区は特に良好の傾向が見られた．次に生育の初期より95%区では葉が全般的に黄色を帯び特に新葉に於て葉脈とその隣接部分を除き葉片の周縁部から内側にかけて黄色を呈していた．75%区に於ても初期に於ては若干此の傾向が見られたが生育の進むにつれて此の傾向は薄れ後期には全然見られなかつた．之等両区に於ける葉の黄色を帯びる傾向は主として多湿がその原因になつているのではないかと思われる．一方25%区では之と異り下位葉が上述の様な部分による区別なく全体的に稍々黄色を帯び若干落葉するものも見られたが之は主として乾燥の影響によるものと思われる．55%と35%の両区では葉の緑色最も濃く上述の様な他区に見られた黄色を帯びる傾向は認められなかつた．収穫時に於ける地上部の生育状態を第3図に示した．

A, B, C, D, and E represent 95%, 75%, 55%, 35%, and 25%, respectively.

Fig. 3. Comparison of the Growth of Geranium at the Harvest Time among Different Treatments

3. 収　量

地上部並に根部の各部の収量を第2表に示した．収量の各項目について分散分析を行つた結果何れの項目についても1%水準で区間の差の有意性が認められた．地上部に於ては葉の各部の生体重，茎の全長並に生体重の何れも55%区最大であり該区と他区との差は全て有意義で地上部各部の生育は該区に於て最も良好な事が認められ

Table 2.　Comparison of the Yield of Geranium among Different Treatments

Soil moisture	Top									
	Fresh weight of all parts of top		Fresh weight of whole leaves (B+P+S)		Fresh weight of leaf-blades (B)		Fresh weight of petioles (P)		Fresh weight of stipules (S)	
%	g	Ratio	g	Ratio	g	Ratio	g	Ratio	g	Ratio
95	108.9	43	79.8	47	61.7	48	16.2	42	0.9	64
75	221.8	88	153.2	90	114.7	89	35.6	92	1.3	93
55	252.5	100	170.0	100	128.6	100	38.6	100	1.4	100
35	201.3	80	141.0	83	108.5	84	30.5	79	1.0	71
25	93.2	37	68.0	40	53.1	41	13.5	35	0.6	43
L.S.D. (5%)	21.51		13.77		10.43		3.44		0.18	
L.S.D. (1%)	29.33		18.78		14.27		4.69		0.24	

Soil moisture	Top				Roots			
	Total length of stem		Fresh weight of stem		Fresh weight		Air-dried weight	
%	cm	Ratio	g	Ratio	g	Ratio	g	Ratio
95	80.6	34	34.3	39	10.5	31	1.6	33
75	176.2	73	75.2	85	32.1	94	3.5	71
55	240.1	100	88.9	100	28.1	82	4.1	84
35	181.5	76	65.8	74	34.2	100	4.9	100
25	76.8	32	27.4	31	24.3	71	3.9	80
L.S.D.(5%)	24.39		9.7		4.80		0.74	
L.S.D.(1%)	33.29		13.2		6.54		1.01	

る．次で全茎長を除き各部の生体重は75%区，35%区の順に若干低下するが之等両区間の差は比較的少い．従つて又75%から35%位の範囲内の土壤水分の下では地上部の生育は比較的良好である事が認められる．然し95%区及び25%区の順に之等両区では各部の生体重は何れも著しく低下し之等両区では各部の生体重は何れも著しく低下し之等両区と前3区との差は極めて大きくその有意性は高い．即ち之等両区では夫々過湿並に乾燥による地上部各部の生育の阻害が顕著に認められる．

根部は生体重，風乾重共に35%区最大で根部の生育は該区に於て最も良好の傾向が認められる．次で生根重に於ては75%，55%，25%，及び95%の各区の順に低下しているが，風乾根重に於ては55%，25%，75%，及び95%の各区の順に低下し，95%区では過湿による根の生育の阻害が特に顕著に認められる．一方25%区に於ては根の生育は比較的良好であり従つて相当な乾燥の下でも根はかなり良く生育する事が認められる．

4. 成葉の特徴

成葉の特徴を第3表に示した．分散分析の結果葉柄長，葉片長，葉片幅，並に1枚当生葉重の何れも1%水準に於て区間の差の有意性が認められた．之等の何れも55%区最大で75%及び35%の両区は55%区に比べると僅かに劣る傾向が認められるが之等3区間の差は何れも有意義でない．95%及び25%の両区では之等両区間の差は極めて小さいが之等両区の値は前3区の値に比べると何れも著しく劣つており夫々過湿並に乾燥の為葉形が著しく小形となり，従つて又1枚当生葉重も極めて小さい事が注目される．次に生葉の含水率は供試葉数が少いので稍

Table 3. Comparison of the Characters of Fully Developed Leaves of Geranium among Different Treatments

Soil moisture	Length of petioles		Length of leaf-blades		Width of leaf-blades		Fresh weight per leaf		Water content of fresh leaves
%	cm	Ratio	cm	Ratio	cm	Ratio	cm	Ratio	%
95	7.6	70	10.1	74	16.0	72	2.3	59	84.3
75	10.8	100	13.0	96	20.9	95	3.8	97	86.2
55	10.8	100	13.6	100	22.1	100	3.9	100	85.6
35	10.2	94	13.0	96	21.5	97	3.7	95	84.8
25	7.9	73	10.5	77	16.6	75	2.2	56	84.0
L.S.D.(5%)	1.37		1.20		2.21		0.61		N.S.
L.S.D.(1%)	1.87		1.63		3.01		0.83		N.S.

々正確を欠く恐れがあるが75%区最高で55%，35%，95%，及び25%の各区の順に除々に低下しており，過湿並に乾燥は生葉の含水率を稍々低下させる傾向が認められる．然し分散分析の結果区間の差の有意性は認められなかつた．

5. 含油量

生葉並に生茎の含油量を第4表に示した．該表から判る様に精油の大部分は葉に含まれており茎には殆んど無く茎の含油率，全収油量は何れも極めて低いので実際上殆ど問題にならない．以下葉についてみるに生葉の含油

Table 4. Comparison of the Oil Content of Fresh Leaves and Fresh Stem of Geranium among Different Treatments

Soil moisture	Fresh leaves			Fresh stem	
	Oil content	Total yield of oil		Oil content	Total yield of oil
%	%	cc	Ratio	%	cc
95	0.47	0.364	53	0.00	0.008
75	0.41	0.625	91	0.00	0.021
55	0.41	0.687	100	0.00	0.021
35	0.43	0.601	87	0.01	0.021
25	0.46	0.313	46	0.01	0.008
L. S. D. (5%)	0.04	0.067			
L. S. D. (1%)	0.05	0.091			

率，全収油量共に分散分析の結果1%水準に於て区間の差の有意性が認められる．含油率に於ては95%区は0.47%で最高値を示し次で25%区，35%区の順に徐々に低下し75%，55%の両区では何れも0.41%の最低値を示している．この様に含油率に於ける各区間の差は比較的小さいが95%，25%の両区と75%，55%の両区間の差は何れも有意義であり，従つて極端な多湿や乾燥の下では生葉の含油率は若干高くなる傾向が認められる．

次に全収油量に於ては55%区最大で75%，35%，95%，及び25%の各区の順に低下している．95%及び25%の両区では含油率は稍々高いけれども既述の様に生葉重が極めて小さいので之等両区と他の3区間に於ける全収油量の差は矢張り極めて大きく，全般的に全収油量は全生葉重とかなり似通つた傾向を示している．

Table 5. Comparison of the Specific Gravity and Reflactive Index of Geranium Oil among Different Treatments

Soil moisture	Specific gravity	Reflactive index
%	D_{25}^{25}	n_{25}^{D}
95	0.883	1.4600
75	0.881	1.4597
55	0.879	1.4590
35	0.881	1.4590
25	0.882	1.4597

6. 油の比重並に屈折率

油の比重並に屈折率を第5表に示した．比重は供試油量少く稍々正確を欠く恐れがあるが55%区最低で次で75%，35%の両区更に25%区，95%区の順に稍々上昇する傾向が見られる．又屈折率に於ては55%，35%の両区最低で，次で75%，25%の両区，更に95%区の順に上昇している．従つて過湿，乾燥共に油の比重並に屈折率を稍々上昇せしめる傾向が認められる．

考　　察

本実験の結果によれば地上部の生育は55%区最も良好であり又35%区の様な相当乾燥した区に於ても75%区との差は比較的少い程度に良好であり，且つ根部の生育に於ては35%区最も良好で最も乾燥した25%区に於てもかなり良好の結果が得られている事から，ゼラニウムは比較的低い土壌水分の下で生育の良好な傾向が認められる．本実験に用いた土壌と殆んど同じ土壌を用い又本実験と殆んど同様の実験方法で著者[2] (1954) が土壌水分とムラサキオモトの初期生育との関係について又著者等[3] (1955) が土壌水分とレモングラスの生育並に含油量との関係について行つた研究によれば之等作物の生育に対する最適土壌水分は夫々容水量の90～60%及び80%附近であつた事から考えてもゼラニウムが比較的低い土壌水分に適した作物である事が裏付けられると思う．土壌水分は当然土壌の通気と密接な関係があるのでゼラニウムが比較的低い土壌水分の下で生育の良好な事は一面本作物の土壌中の酸素の要求度が比較的高い事による事も想像されるが，かかる問題については尚今後の研究を要する．

生葉の含油率が過湿並に乾燥の下では稍々上昇する傾向が見られたが既述の著者等[3] (1955) のレモングラスの研究に於ても同様の傾向が見られており之は過湿や乾燥により精油の生成が旺盛になつた事によるのではなく過湿や乾燥による生葉の含水率の低下が必然的に生葉の含油率の上昇を来たしたものと考えた．本実験の場合も之と同様の事が想像されるがこの関係は余り明瞭でない．唯之等過湿や乾燥により生葉の含油率が若干上昇するに

しても土壌水分による含油率の差異は比較的少いので全収油量は含油率よりも全生葉重によつて大きく左右される事になる．従つて又全収油量を考慮に入れてもゼラニウムの栽培に対する最適土壌水分は本実験に於ける土壌水分の区別内では55%前後であつて本作物が比較的低い土壌水分に適するという事に変りはない様である．

過湿或は乾燥の下に生育した植物の油の比重並に屈折率が何れも稍々高くなる傾向が見られたが，かかる傾向は著者等[3]（1955）のレモングラスの研究に於ても認められており香料作物の油に於ては或程度共通した傾向かと思われる．

摘　　要

ポット試験で土壌容水量の95%，75%，55%，35%，及び25%の5区を設け主として土壌水分がゼラニウム（**Pelargonium denticulatum** JACQ.）の生育並に含油量に及ぼす影響について研究したが，同時に油の1，2の物理的性質等についても若干の研究を行つた．その結果の概要は次の通りである．

1）地上部の生育は55%区最も良好で75%区，35%区の順に低下し，更に95%区，25%区の順に之等両区では著しく低下する．即ち極端な乾燥の下では過湿の場合と同じく地上部の生育は著しく阻害されるけれども，本植物は地上部の生育については比較的低い土壌水分に適する傾向が認められる．

2）根部の生育に適する土壌水分は地上部の場合よりも更に若干低い傾向が認められ，35%区に於て生育最も良好で25%区に於てさえ乾燥による生育の阻害は余り顕著でない．然し95%区に於ては過湿による生育の阻害が顕著に認められる．

3）成葉の葉形は55%区最大で1枚当生葉重も亦該区に於て最大である．75%及び35%の両区では葉の大きさは55%区よりも僅かに小さくなる傾向が認められるが之等3区間の差は極めて小さい．然し乍ら95%及び25%の両区では夫々過湿並に乾燥の影響により他区に比べて葉形は著しく小さく，従つて又1枚当生葉重も著しく小さくなる傾向が認められる．

4）生葉の含水率は75%区最大で55%，35%，95%，及び25%の各区の順に徐々に低下し過湿，乾燥共に生葉の含水率を稍々低下させる傾向が認められる．

5）精油は主として葉部に存在し茎部には極めて少い．生葉の含油率は75%及び55%の両区最低で35%，25%，及び95%の各区の順に徐々に上昇し，過湿並に乾燥の下では含油率は稍々上昇する傾向が認められる．然し乍ら土壌水分の差異に基く生葉の含油率の差異は比較的小さいので全収油量は全収葉量によつて最も大きく左右される事になり，55%区最大で75%，35%，95%，及び25%の各区の順に低下し特に後2区に於ける低下が著しい．

6）油の比重は55%区最低で75%区と35%の両区，25%区，次で95%区の順に増大し，屈折率は55%と35%の両区最低で75%と25%の両区，次で95%区の順に増大する．従つて過湿並に乾燥の下では比重，屈折率共に稍々増大する傾向が認められる．

文　　献

1）Guenther, E. : The Essential Oils, Vol. IV, D. Van Nostrands, New York, 1950, P. 671～737.

2）宮崎幸男：衛試報，72：241～255（1954）.

3）宮崎幸男，高城正勝：衛試報，73：277～287（1955）.

4）Sievers, A. F., Lowman, M. S. and Marshall, C. G. : *Amer. Perfumer*, 26 : 683～687（1931）; 27 : 28～30（1932）.

Summary

In pot experiment, five plots of different soil moisture contents, 95%, 75%, 55%, 35%, and 25% of the water capacity, were prepared, and the effects of the soil moisture chiefly upon the growth and oil content of geranium (*Pelargonium denticulatum* JACQ.) were investigated. At the same time, the effects on some physical properties of the oil were also studied. Results obtained are summarized as follows :

1) The growth of the top was seen to be best at the 55% plot, and gradually decreased in order of the plots of 75% and 35%, and remarkably decreased in order of the plots of 95% and 25%. Namely

relatively low soil moisture seems to to be suitable for the top growth of the plant, though the growth was remarkably retarded at an extremely dry condition as well as at an overmoist condition.

2) The suitable soil moisture content for the growth of the roots was found to be lower than that for the growth of the top; the 35% plot showed the best result and the 25% plot also showed a relatively good result. On the other hand, a conspicuous retardation of the root growth due to an overmoist condition was recognized in the 95% plot.

3) The size of fully developed leaves was largest in the 55% plot, and the fresh weight per leaf was also greatest in this plot. In the plots of 75% and 35%, the size of the leaves tended to be slightly smaller than that in the 55% plot, though differences among these three plots were insignificantly small. However, in the plots of 95% and 25%, the size of the leaves and also the fresh weight per leaf were remarkably smaller than those in the other plots, being affected by excess or deficiency of the soil moisture.

4) The water content of fresh leaves was highest in the 75% plot, and gradually decreased in order of the plots of 55%, 35%, 95%, and 25%, respectively; namely, it tended to decrease somewhat at a very high or very low soil moisture content.

5) The essential oil is contained mainly in the leaves and little in the stem. The percentage of oil content in the fresh leaves was lowest in the plots of 75% and 55% and gradually increased in order of the plots of 35%, 25%, and 95%, respectively. From this, the percentage of oil content tended to increase somewhat at a very high or very low soil moisture content. However, since the variation in the percentage of oil content due to different soil moisture contents was relatively small, the total yield of oil per plant tended to be influenced mostly by the total yield of leaves; it was highest in the 55% plot, and decreased in order of the plots of 75%, 35%, 95%, and 25%, respectively, especially in the last two plots.

6) The specific gravity of the oil was lowest in the 55% plot, and increased in order of the plots of 75% and 35%, 25%, and 95%, respectively. The reflactive index of the oil was lowest in the plots of 55% and 35%, and increased in order of the plots of 75% and 25%, and 95%, respectively. This explains that both the specific gravity and reflactive index of the oil tend to increase at a very high or very low soil moisture content.

Received June 18, 1957.

ケシ（*Papaver somniferum* L.）の生育並びに収量に及ぼす肥料成分の影響について

木 下 孝 三

Studies on the Effects of Manurial Elements upon the Growth and the Yield of Opium Poppy (*Papaver somniferum* L.)

Kozo Kinoshita

まえがき　けし栽培が復活し一般栽培に移されてから既に２ヶ年になるが，この間品種の退化，耕種肥培管理の不適切，気象の悪条件等にわざわいされて収量品質共に往年の域に達していない現状である．特に戦後始めて新しく栽培された地域に於て然りとする．品種及び気象の問題はしばらくおき，肥培管理についてみるにけしはその未熟な蒴果を切傷し分泌して来る液汁を収穫するのであり，他の一般作物とは甚だしく趣を異にしている．従つてその肥培管理に於ても著しく異なり基肥追肥を少なくし最後の止肥に重点を置き採汁期に於ける草勢を旺盛にならしめ最後まで完全に採汁し得るよう肥培管理を行うことが必要である．此く特殊な施肥法を行うけし栽培に於て肥料要素と生育，収量，品質等の関係を明らかにすることは極めて重要な問題であると考えられる．著者は和歌山薬用植物栽培試験場の圃場に於て昭和30年概括的な圃場試験を，昭和31年圃場試験並びに詳細な枠試験を併せ行いこれらの関係につき試験した．若干の成績を得たのでここに報告する次第である．

材料及び方法．材料　本試験に使用したけしの品種は一貫種系統のもので各６月上旬当試験場で採種したものである．

方法　1．圃場試験　両年度とも同一圃場を使用し地力を均一にするため前作は水稲の無肥料栽培を行つた．土壌は稍粘質の壌土である．試験区は三要素区（NPK）．無窒素区（PK）．無燐酸区（NK）．無加里（NP）．無肥料区（O）の５区とし１区面積５坪の１区制とした．肥料は窒素，燐酸，加里夫々反当4.03貫，1.20貫，2.33貫とし硫安，過燐酸石灰（16％），硫酸加里を以つてした．基肥に全量の５％，追肥に20％，止肥に75％の割に夫々適期に施用した．別に起耕前に各区共石灰反当30貫の割で施用した．栽培法はけし栽培耕種基準に準じた．即ち幅４尺の高畦とし条間２尺の２条播とする．播種期11月８日条播とし播種量は反当300g，播種後覆土せず籾殻を以つて被覆する．播種前予め種子はウスプルン500培液にて３時間浸漬消毒しておく．発芽後の間引は３回（１月中旬，２月中旬，３月上旬）最後の間引に於て株間５寸の間隔とする．中耕は施肥除草を兼ね３回（12月下旬，２月上旬，４月上旬），腋芽は伸出の都度摘芽し１本仕立とする．採汁は切取法を以つてし隔日４回切とした．液汁の乾燥は乾燥箱内で電熱により乾燥した．その他の管理としては３月下旬より５月下旬の間病害防除のため８斗式ボルドー合剤を反当１石５斗の割で３回撒布した。モルヒネの定量は薬局法追補４で改正されたあへん未定量法によつた．

2．枠試験

長さ，幅，深さ夫々121cm，121cm，90cmのコンクリート枠を用い，土壌は前記圃場試験の土壌を使用し，上部より耕土27cm，水田床土12cm，底土（礫を多量に含んだ粘質土）51cmの深さにつめて栽培した．試験区は同様三要素区（NPK），無窒素区（PK），無燐酸区（NK），無加里区（NP），無肥料区（O）の５区とし各区共５個体宛供試した．肥料は窒素，燐酸，加里夫々22.4g，6.7g，12.9gとし硫安，過燐酸石灰（16％）．硫酸加里を以つてした．基肥に全量の５％，追肥に20％，止肥75％の割に夫々適期に施用した．別に各区共播種前耕土に石灰166gを撒布しよく混和せしめておいた．その他の管理，栽培法等はすべて圃場試験に準じた．昭和30年11月８日播種し発芽後10日毎に草丈，葉数，その他外見的に認められる生育上の差異について調査し，翌31年５月21日採汁開始，５月29日終了，６月５日地上部，地下部を収穫し，各部の生育状態について調査し各区間の比較を行つた．モルヒネの定量はイオン交換樹脂を前処理としてモルヒネを分離したる後フォリン試薬を使用して吸光係数を測定比色定量した．

実験結果　1．圃場試験

1） **一般生育状態**　両年度とも発芽後各区とも生育順調に進み，第2回間引期の頃までは各区間の差異は殆んど認められなかつた．第3回間引の頃よりO．PKは次第に生育劣る傾向を示し葉色は稍黄変し明らかに窒素欠乏の徴候を示して来た．3月下旬茎葉長伸期に入りこの傾向は益々顕著になつてきた．しかし両者間の差異は殆んど認められなかつた．NK，NP，NPK の3区は共に生育すぐれ腋芽の発生も著しかつた．しかし区間の差異は殆んどこれを認めなかつた．5月上旬花開期に入つたがNPKが最も早く開花し且整一であつた．他は共に幾分遅延する傾向が認められた．5月下旬採汁収穫したが昭和31年に於ては開花期より採汁収穫期へかけての降雨の連続，低温持続の異状の悪天候により各区とも液汁の分泌少なく且降雨による流亡等によりあへん収量の激減を来たした．

2） **収穫調査**　収穫調査の結果を示すと第1表の通りである．

Table 1. Comparison of Yield of the Opium in Different Treatments.

Year	Treat-ment	Height of plant		Per Tan* Yield of opium		Morphine content		Yield of morphine	
		cm	Ratio	kg	Ratio	%	Ratio	g	Ratio
1955	NPK	125.6	100	3.612	100	15.58	100	562.7	100
	PK	118.0	94	2.016	56	14.93	93	292.9	52
	NK	123.2	98	3.684	102	14.66	94	540.0	96
	NP	126.6	101	3.588	99	14.97	96	538.1	96
	O	110.6	88	1.488	41	14.00	90	208.3	37
1956	NPK	116.5	100	2.012	100	15.04	100	302.6	100
	PK	102.2	88	0.846	42	14.22	95	120.3	40
	NK	117.4	101	1.858	92	14.20	94	263.8	87
	NP	115.0	99	1.852	92	14.64	97	271.1	90
	O	102.2	88	0.703	35	13.97	93	98.2	32

* Tan is equivalent to about 0.1 hectare.

採汁期の草丈についてみるにNPK最大を示しNP，NKと順次し三者の差異は極めて僅少である．PKは可なり劣り，Oは更に著しく劣つている．反当あへん収量は年度によつて数値の差は可なり認められるが比較数に於てはNPK最大を示し時にNK最大を示す場合も認められるがNK，NPと順次し両者の差異は僅少である．PKは相当の減収を示しOは更に減収を示している．反当モルヒネ収量に於ても同様の傾向を示している．モルヒネ含量についてはNPK最も高くNP，NK，PKと順次し三者の差異は僅少である．Oはそれより稍劣つているのが認められる．

2． **枠試験**

1） **一般生育状態**　先ず主茎長について見ると第1図にみられる通り生育の初期に於ては各区間の差異は殆んど認められないが，3月に入つてからNPK，NK，NPは共に生育良好でPK，Oは共に生育の劣る傾向が認められ，この傾向は茎葉伸長期に入り益々顕著にあらわれ開花期を経て生育の終期に到るまで持続した．NPK，NK，NP間の差異及びPK，O間の差異は共に極めて僅少であつた．

葉数についてみるに生育に伴う増加率は各区間の差異は殆んど認められないが3月上旬頃よりPK，Oの両区は葉色稍黄変し明らかに窒素欠乏の徴候を呈しその後生育の進

むにつれ益々顕著にこの特徴がみとめられた．腋芽は発生の都度摘芽したがその発生状況を見るに第2表の通り発生数及び重量に於てNPK最大でありNK，NPと相順次して劣り両者の差は僅少であつた．PK，Oは更に著しく劣り且両者の差異は僅少であつた．

Table 2. Comparison of Lateral Buds of Main Stem in Different Treatments.

Treatment	Number of lateral buds		Fresh weight of lateral buds	
	g	Ratio	g	Ratio
N P K	4.8	100	8.2	100
P K	3.0	63	2.9	36
N K	5.0	104	6.0	75
N P	4.4	92	5.6	70
O	2.4	50	2.3	29

外見的に観察される一般生育状態に於ては窒素の影響最も大きくその欠乏区では主茎の伸長を阻害し着生する葉も葉形は小形で葉色は黄色を帯び窒素欠乏による茎葉の生育障害が顕著に認められた．且生育の後期に於ける腋芽の発生についてもその数及び量が他区に比して著しく少なく草勢の低下が認められ生育が著しく阻害されている．燐酸及び加里は共にその影響は余り認められていない．

2） **収穫調査** 収穫調査の結果を示すと第3表の通りである．

Table 3. Comparison of Yield of the plant in Different Treatments.

Treatment	Fresh weight of top		Eresh weight of leaves		Fresh weight of stem		Diameter of stem at 15cm height	Fresh weight of capsule		Vertical diameter of capsule	Lateral diameter of capsule	Fresh weight of roots	
	g	Ratio	g	Ratio	g	Ratio	cm	g	Ratio	cm	cm	g	Ratio
N P K	246.8	100	98.4	100	100.0	100	1.39	48.4	100	7.44	5.57	39.8	100
P K	176.0	71	66.0	67	74.4	74	1.16	35.6	74	7.32	4.64	26.2	66
N K	230.6	93	87.2	89	98.8	99	1.32	44.8	93	7.49	5.46	35.0	88
N P	210.2	85	70.0	71	97.6	98	1.34	43.6	90	7.24	5.37	39.0	98
O	163.4	66	61.3	63	69.0	69	1.05	32.6	67	7.23	4.62	24.0	60

1. 地上部生体重 NPK最大値を示しNKこれに次ぎNPと可なり劣りPK，Oはこれらに比して更に著しく劣り両者の差異は極めて僅少である．分散分析の結果は第4表の通りでその区間の差異は極めて有意義である．次に各区間の差異及びその有意性についてしらべた結果は第5表に示す通り，NPKとPK，O，NKとO，及びNPとOとの間の差異は極めて有意義である．

Table 4. Analysis of Variance of Fresh Weight of Top.

Source of variance	Degrees of freedom	Sum of squares	Variance	F
Treatment	4	25,002	6,250.50	5.82**
Individual	4	8,870	2,217.50	2.06
Error	16	17,158	1,072.37	
Total	24	51,030		

** Represents significance at the 1% level.

Table 5. Comparison of Differences of Fresh Weight of Top among Treatments and Their Significance.

	NPK 246.8	P K 176.0	N K 230.6	N P 210.2	O 163.4
NPK 246.8	—				
P K 176.0	**70.8	—			
N K 230.6	16.2	27.6	—		
N P 210.2	36.6	34.2	20.4	—	
O 163.4	**83.4	12.6	**67.2	*46.8	—

L.S.D. 5% level 43.9
L.S.D. 1% level 60.5

* Represents significance at the 5% level.
** Represents significance at the 1% level.

2. 葉及び茎，地上部は葉，茎及び蒴果に分けられるが生葉重，生茎重については地上部生体重と同様の傾向が認められる．次に茎の太さについてみるにNPK最大でNP，NKと順次し三者の差異は極めて僅少である．PK Oは前者に比し可なり細く劣り且両者の差異は僅少である．

3. 蒴果　先ず形状についてみるに共に楕円球をなしているが縦径は各区間の差異は極めて少く殆んど認められないが横径に於てはNPK，NP，NKの三者は殆んど差異なく長くPK，Oは共にこれより可なり短く両者の差異は認められない．即ちNPK，NP，NKの三者は太く丸型を呈しPK，Oの両者は細長い楕円球をなしている．生果重量についてみるとNPK最大値を示しNP，NKと相順次して稍劣り両者の差異は少い．続いてPK，Oと順次し更に著しく劣り両者の差異は僅少である．分散分析の結果並に区間の差異及びその有意性については第6表，第7表に示す通り区間の差異は有意であり各区間の差異についてはNPKとPK，O，NKとO及びNPとOとの間には有意の差異が認められる．

Table 6. Analysis of Variance of Fresh Weight of Capsules.

Source of variance	Degrees of freedom	Sum of squares	Variance	F
Treatment	4	1,378.40	344.60	*4.68
Individual	4	439.60	109.90	1.49
Error	16	1,178.00	73.62	
Total	24	2,996.00		

* Represents significance at the 5% level.

Table 7. Comparison of Differences of Fresh Weight of Capsules among Treatments and Their Significance.

	NPK 48.4	P K 35.6	N K 44.8	N P 43.6	O 32.0
NPK 48.4	—				
P K 35.6	*12.0	—			
N K 44.8	3.6	9.2	—		
N P 43.6	4.7	8.0	1.2	—	
O 32.0	**16.4	3.6	*12.8	*11.6	—

L.S.D. 5% level 11.5
L.S.D. 1% level 15.8

* Represents significance at the 5% level.
** Represents significance at the 1% level.

4. 生根重 NPK 最大を示し NP これに次ぎその差異は僅少である．NK はこれより稍劣り PK，O と順次し更にいちじるしく劣り両者の差異は僅少である．第8表，第9表に示す通り分散分析の結果区間の差異については有意性が認められ，各区間の差異については NPK と PK，O，PK と NP 及び NP と O との間には有意の差異が認められる．

Table 8. Analysis of Variance of Fresh Weight of Roots.

Source of variance	Degree of freedom	Sum of squares	Variance	F
Treatment	4	1,066.40	266.60	3.73*
Individual	4	471.20	117.80	1.64
Error	16	1,142.40	71.40	
Total	24	2,680.00		

* Represents significance at the 5% level.

Table 9. Comparison of Differnces of Fresh Weight of Roots among Treatments and Their Significance.

	NPK 39.8	P K 26.2	N K 35.0	N P 39.0	O 24.0
NPK 39.8	—				
P K 26.2	13.6*	—			
N K 35.0	4.8	8.8	—		
N P 39.0	0.8	12.8*	4.0	—	
O 24.0	15.8**	2.2	11.0	15.0*	—

L.S.D. 5% level 11.5
L.S.D. 1% level 15.8

* Represents significance at the 5% level.

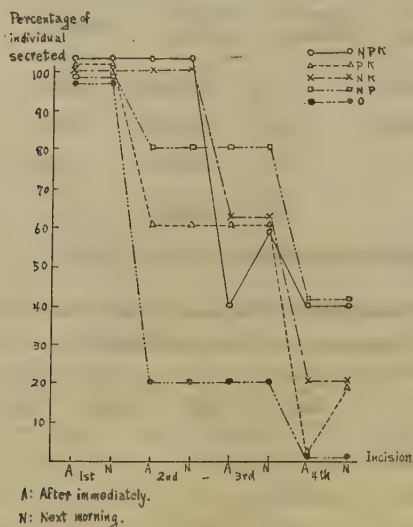
** Represents significance at the 1% level.

以上によると窒素の影響最も強くあらわれその欠乏は葉，茎，蒴果，根等の生育を著しく阻害する傾向が認められる．燐酸はその影響余り認められずその欠乏は根部の生育に稍悪影響を及ぼしている．加里は窒素ほどでないが燐酸より影響が稍大きくその欠乏は葉の生育を阻害するのが認められる．

3) **収量調査** あへん収量，モルヒネ含量，種子収量等は第10表に示す通りである．

Table 10. Comparison of Yield of Opium, Morphine Content and Yield of Seeds in Different Treatments.

Treatment	Yield of opium		Morphine content		Yield of morphine		Yield of seeds		Weight of 1,000 seeds	
	g	Ratio	%	Ratio	mg	Ratio	g	Ratio	g	Ratio
N P K	0.308	100	13.38	100	41.2	100	2.84	100	0.402	100
P K	0.178	58	13.20	98	23.4	56	2.10	74	0.316	79
N K	0.299	97	13.32	99	39.8	96	2.54	89	0.365	91
N P	0.289	94	13.58	101	39.2	95	2.76	97	0.390	97
O	0.103	33	13.26	99	13.6	33	1.48	52	0.243	60

1. 液汁分泌状況　5月21日採汁を開始したが採汁期間中は降雨の連続，低温持続等の気象的悪条件に際会したため一般に分泌量の低下を来たした．切傷回数の進むにつれて液汁分泌量の低下率は第2図に示す通りである．図は単に分泌せる個体の百分率を示している．

第1回切傷に於ては全個体分泌し各区間の差異は認められない．第2回切傷に於ては NPK，NK は低下を認めず他は早くも低下を示し NP，PK，Oと順次しO は最も著しく低下している．第3回切傷に於ては全般に可なりの低下を示し NP 最も低下率少なく NK，PK，NPK，Oと順次し，第4回切傷に於ては更に益々低下し NP K，NP，NK，PK，Oと順次しOに至つては全く分泌を停止してしまつている．全期間を通じてみると NPK 最も低下率少なく NP これに次ぎ両者の差異は僅少である．NK はこれに比し稍低下し PK は更に著しく低下し O は最も著しく低下している．

2. あへん収量　NPK 最大値を示し NK，NP と順次し稍劣り両者の差異は僅少である．PK はこれより更に著しく劣り O は最も著しく劣つている．分散分析並びに区間の差異及びその有意性は第11表，第12表の如くで NPK と PK，O，PK と NK，NP，NK と O 及び NP と Oの間には有意の差異が認められる．

Table 11. Analysis of Variance of Yield of Opium.

Source of variance	Degrees of freedom	Sum of squares	Variance	F
Treatment	4	0.16548	0.04137	6.37**
Individual	4	0.01546	0.00386	1.68
Error	16	0.10389	0.00649	
Total	24	0.28483		

** Represents significance at the 1% level.

Table 12. Comparison of Differences of Yield of Opium among Treatments and Their Significance.

	NPK 0.308	P K 0.178	N K 0.299	N P 0.289	O 0.103
NPK 0.308	—				
P K 0.178	0.130*	—			
N K 0.299	0.009	0.121*	—		
N P 0.289	0.019	0.111*	0.010	—	
O 0.103	0.205**	0.075	0.196**	0.181**	—

L.S.D. 5% level. 0.108
L.S.D. 1% level. 0.149

* Represents significance at the 5% level.

** Represents significance at the 1% level.

3. モルヒネ含量 NP 最大を示し NPK, NK, O, PK の順に低下しているがその差はきわめて僅少である．区間の差異は第 13 表の通り有意義でない．

Table 13. Analysis of Variance of Morphine Content.

Source of variance	Degrees of freedom	Sum of squares	Variance	F
Treatment	4	4.4424	1.1106	1.05
Individual	4	3.5034	0.8758	1.20
Error	16	16.9146	1.0571	
Total	24	24.8604		

4. モルヒネ収量 あへん収量と同様の傾向が認められ NPK 最大を示し NK, NP と順次して劣つている．しかし両者の差はきわめて僅少である．PK はこれより更に著しく劣り，O は最も著しく劣つている．分散分析並びに区間の差異及びその有意性は第 14 表及び第 15 表の通りで NPK と PK, O, PK と NK, NP, NK と O 及び NP と O の間には有意の差異が認められる．

Table 14. Analysis of Variance of Yield of Morphine.

Source of variance	Degrees of freedom	Sum of squares	Variance	F
Treatment	4	3,096.36	774.09	8.29**
Individual	4	252.44	63.11	1.47
Error	16	1,493.56	93.34	
Total	24	4,842.36		

** Represents significance at the 1% level.

Table 15. Comparison of Differences of Yield of Morphine among Treatments and Their Significance.

	NPK 41.2	P K 23.4	N K 39.8	N P 39.2	O 13.6
NPK 41.2	—				
P K 23.4	17.8**	—			
N K 39.8	1.4	16.4*	—		
N P 39.2	2.0	15.8*	0.6	—	
O 13.6	27.6**	9.8	26.2**	25.6**	—

L.S.D. 5% level 12.9
L.S.D. 1% level 17.8

* Represents significance at the 5% level.

** Represents significance at the 1% level.

5. 種子収量及び1,000粒重量　NPK最大を示しNPこれに次ぎ稍劣りNK，PKの順に更に劣りOは最も著しく劣つている．分散分析並びに区間の差異及びその有意性は第16表，第17表の通りでNPKとPK，O，NKとO及びNPとOの間の差異は有意義である．1,000粒重量についても同様の傾向が認められる．

Table 16. Analysis of Variance of Yield of Seeds.

Source of variance	Degrees of freedom	Sum of squares	Variance	F
Treatment	4	6,318	1.5795	5.13**
Individual	4	1,114	0.2785	1.10
Error	16	4,860	0.3075	
Total	24	12,292		

** Represents significance at the 1% level.

Table 17. Comparison of Difference of Yield of Seeds among Treatments and Their Significance.

	NPK 2.84	P K 2.10	N K 2.54	N P 2.76	O 1.48
NPK 2.84	—				
P K 2.10	0.74*	—			
N K 2.54	0.30	0.44	—		
N P 2.76	0.08	0.66	0.22	—	
O 1.48	1.36**	0.62	1.06**	1.28**	—

L.S.D. 5% level 0.74
L.S.D. 1% level 1.02

* Represents significance at the 5% level.

** Represents significance at the 1% level.

総　　括

本試験に於ては圃場試験に於ても枠試験に於ても窒素の影響は最も顕著にあらわれその欠乏の下では植物の生育は著しく阻害される．即ち葉，茎，蒴果，根等植物の各部分にその影響が顕著にあらわれているのが認められる．又液汁分泌能力にも著しく影響を及ぼしあへん収量の減少を来している．燐酸及び加里は幾分その影響が認められるがその程度は共に少ない．燐酸の欠乏は根の生育及び種子の生産に加里より稍大なる影響をあたえ，加里の欠乏下では地上部の生育及びあへん収量に燐酸より稍大なる影響をうけている．しかし共に窒素に比すれば遙かにその影響が少ないのが認められる．故に本植物栽培に当つては窒素質肥料の量及び種類の撰択配合が最も重要な問題であると考えられる．燐酸質及び加里質肥料についてもその重要度は窒素ほどではないがやはり欠くことの出来ないものであると考えられる．

終りにモルヒネ定量に関し多大の御協力を賜つた大阪支所の喜谷所長，中川技官，その他の各位に対し謝意を表する次第である．

摘　　要

1956年和歌山薬用植物栽培試験場の土壌を用いてケシの生育並びに収量に及ぼす肥料成分の影響について試験した．試験区は三要素区（NPK），無窒素区（PK），無燐酸区（NK），無加里区（NP）及び無肥料区（O）の5区を設けた．結果は次の通りである．

1.　一般に植物の生育は三要素区最上であるが無燐酸区及び無加里区との差は僅少である．無燐酸区と無加里区，無窒素区と無肥料区とは共に互に生育状況は似ている．しかし後者は遙かに前者より劣つている．即ち窒素の影響は最も強くあらわれ燐酸及び加里の影響も幾分認められている．

2.　地上部生体重は三要素区最大であり無燐酸区はこれより稍劣り無加里区は更に可なり劣つている．無窒素区及び無肥料区は両者の差は僅少であり共に他区より更に顕著に劣つている．

3.　生葉重，生茎重及び生果重等は共に地上部の場合と同様の傾向が認められる．

4.　地下部生体重は三要素区最大であり無加里区はその差は僅少であるが僅かに劣り無燐酸区はこれより更に可なり劣り無窒素区及び無肥料区に至つては更に顕著に劣つている．

5.　液汁分泌個体の百分率は三要素区最大であり無加里区，無燐酸区，無窒素区，無肥料区の順に減少している．

6.　あへん収量は三要素区最大であり無燐酸区はこれより僅かに劣り無加里区は無燐酸区より更に僅かに劣り三者の差異は僅少である．無窒素区はこれらより著しく劣り無肥料区は更に著しく劣つている．

7.　モルヒネ含量は無加里区最大を示し三要素区，無燐酸区，無肥料区，無窒素区の順に減少している．しかしその差異は僅少である．この場合区間の差異は有意義でない．

8.　モルヒネ収量についてはあへん収量と同様の傾向が認められる．

9.　種子収量は三要素区最大を示し無加里区，無燐酸区，無窒素区，無肥料区の順に減少している．しかし三要素区と無加里区との差は僅少であり無燐酸区は前二者より可なり劣り無窒素，無肥料の両区は更に顕著に劣つている．

10.　種子1,000粒重は種子収量の場合と同様の傾向を示しているのが認められる．

文　　献

1)　宮崎幸男：衛試報 72，231～239（1954）．
2)　厚生省麻薬課編：けし栽培の実際，薬時日報社（1955）．
3)　木下孝三：農及園 31，417～422（1956）．

Summary

Using the soil of Wakayama medical plant experimental farm, the effects of the manurial elements upon the growth and the yield of opium poppy (*Papaver somniferum* L.) were investigated in 1956, by providing five treatments, containing three elements (NPK), without nitrogen (PK), without phosphoric

acid (NK), without potassium (NP), and containing no element (O). Results obtained are summarized as follows.

1. Generally, the growth of plant is best in NPK, but the differences between NPK and NP or NK are small. Between NK and NP, and also between PK and O the growth of plant resembles each other, but in the latter treatments, it is strikingly inferior to that in the formers. Therefore the effects of nitrogen are recognized most conspicuously, and those of phosphoric acid and potassium are somewhat recognized.

2. The fresh weight of top is maximum in NPK, and in NK, it is inferior to that in NPK, and in NP, it is inferior tolerably to NPK, and in PK and O, it is inferior conspicuously to the others, though the differences of them are not remarkable.

3. As to the fresh weight of leaves, stems and that of capsules, the similar tendency to the top is also recognized.

4. The fresh weight of roots is maximum in NPK, and in NP, it is inferior slightly to that in NPK, thongh the differences between of them are not remarkable; and in NK, it is inferior tolerably to NP K and NP, and in PK and O, it is inferior conspicuously to the others.

5. The percentage of individual secreted the latex is maximum in NPK, and decreases in order of NP, NK, PK and O.

6. The yield of opium is maximum in NPK, and in NK, it is slightly inferior to that in NPK, and in NP, it is inferior slightly to NK, but the differences of them are not remarkable. In PK and O, it is inferior conspicuously to the others.

7. The morphine content of opium is maximum in NP, and it descends in order of NPK, NK, O, and PK, but the differences of them are not remarkable, and in this case the differences among the treatments are not significant.

8. As to the yield of morphine, the similar tendency to the yield of opium is recognized.

9. The yield of seeds is maximum in NPK, and decreases in order of NP, NK, PK, and O, but the differences between NPK and NP are not remarkable. In NK, it is inferior torerably to that in the formers, and in PK and O, it is inferior conspicuously to the others.

10. As to the weight of 1,000 seeds, the similar tendency to the yield of seeds is recognized.

Received June 18, 1957

クラムヨモギ (*Artemisia kurramensis* QAZILBASH) の水田裏作について

木 下 孝 三

Studies on the Cultivation of KURAMUYOMOGI (*Artemisia Kurramensis* QAZILBASH) as Winter Crop in Rice Field

KOZO KINOSHITA

まえがき クラムヨモギは1950年我が国に輸入されたサントニン原料植物で川谷氏等が始めてその栽培を発表している.[1),2),3)] その後厚生省に於て全国的試作を行いその結果この植物の生育の適地は西日本であり特に瀬戸内海沿岸の諸県及び和歌山県等であることが判明した. しかし元来この植物は菊科に属する多年生の草木であり, 1年株は生育未だ充分でなく草収量少なくサントニン含量も低いが2年株に至つて急激に生育旺盛となり草収量及びサントニン含量共著しく増加すると報告されている[3)]. 即ち生育2年目に至つてこの植物本来の特性を充分に発現するのである。このため直ちに作物として農家が取入れるには土地利用の上から云つても輪作関係から云つても農業経営に適合しない難点が存在していた. この難点を消解しこの植物本来の特性を充分発現せしめ且農業経営によく適合した方法として苗床, 仮植の2段階をへて水田の裏作物とする栽培法が案出された. 水田の裏作としたのは二毛作田はいづれの地方にも多く存在し且当地方では畑地が少ないからであるが畑作地帯に於ては畑の冬作物として充分栽培し得るものと考えられる. この栽培方法は既に試験栽培の域を脱し香川県, 和歌山県等に於ては実際の生産栽培が行われている現状である. 著者は1955年, 56年の両年にわたつて和歌山薬用植物栽培試験場でこの栽培方法による栽培試験を行い若干の成績を得たのでここに報告する次第である.

材料及び方法 **材料** 1954年12月当試験場圃場で採種したものである.

方法 1955年2月18日苗床に播種, 5月11日仮植圃に移植, 11月10日本田に定植, 翌年5月29日抜取収穫しその日は圃場で日乾後直ちに屋内に収納風乾する. 6月15日風乾完了, 不用部の除去調製を行い収穫を完了する. 即ち栽培期間乾燥期間を合して1年5ヵ月を要する.

実験結果及び考察 1. **苗床** 苗床期間中の気象状況を示すと第1表の通りである.

Table 1. Chief Climatic Factors during the Seed Bed.

Year	Month		Air temperature Mean (c°)	Maximum Mean (c°)	Maximum Absolute (c°)	Minimum Mean (c°)	Minimum Absolute (c°)	Rainfall total (mm)	Number ef days with frost (day)
1955	Feb.	E	7.8	11.9	16.4	3.1	1.6	22.7	2
		M	6.6	11.2	16.2	2.0	−1.7	40.9	4
		L	8.9	14.1	19.0	4.7	−0.8	63.0	3
		A	7.6	12.2	19.0	3.1	−1.7	126.6	9
	Mar.	E	9.2	12.7	18.3	5.8	1.4	44.8	1
		M	11.7	16.5	19.2	6.9	1.4	42.3	0
		L	11.9	15.2	20.3	8.6	5.3	65.5	0
		A	10.9	14.8	20.3	7.1	1.4	152.6	1
	Apr.	E	13.6	18.2	24.4	8.9	1.4	22.3	1
		M	16.7	21.4	28.3	13.0	6.6	157.6	0
		L	15.4	20.2	21.8	10.5	5.3	42.2	0
		A	15.2	20.0	28.3	10.5	1.4	222.1	1
	May.	E	18.1	23.4	26.0	12.9	9.5	32.8	0
		M	19.5	24.6	26.8	14.3	9.0	63.1	0
		L	18.9	24.3	25.6	13.6	9.2	14.5	0
		A	18.9	24.1	26.8	13.6	9.0	110.4	0

E. Early 10 days. M. Middle 10 days. L. Last 10 days. A. Average.

苗床は日あたりのよい管理に便利な場所をえらび幅3尺の上床とする．用土は礫を混じた荒土と落葉との混合土を6寸．表面によく肥えた床土を3寸の厚さに盛上げ周囲を藁又は板でかこう．肥料は苗床坪当り硫安100g．過燐酸石灰100g．木灰1kg．石灰180gを施用し全量基肥として用い予め床土とよく混和して用いる．床土は予め焼土しておく方がよい．追肥は苗床期間中は全くこれを行わない．本圃1反歩の苗を仕立てるには苗床面積3坪を必要とする．播種は歯磨粉の空缶のようなものを利用し底面に1寸釘で3～4ヶ所穴をあけこれに種子を入れ手にて振り撒播する．播種量は反当7gで充分である．播種後は覆土せず籾殻をうすく撒布し平滑な板で軽く鎮圧する．その上に麦藁を約5cmの厚さに被覆し如露で充分撒水する．播種後1週間で発芽を始め10日で発芽揃となる．この間床面を絶体に乾燥さしてはならない．灌水は毎日充分これを行う必要がある．これはクラムヨモギの種子は表面ゼラチン質の被膜でおうわれていて水分を吸収すると膨脹し，乾燥すると収縮する．この膨脹収縮を1～2度くりかえすと被膜がかたくなり幼根の外部への伸長が阻害され遂に発芽不能を来たすからである．発芽しはじめると敷藁を徐々に薄くし発芽揃の頃に全部除去する．発芽後は灌水の必要は殆んどない．発芽後の地上部の生育状況は第1図の通りである．

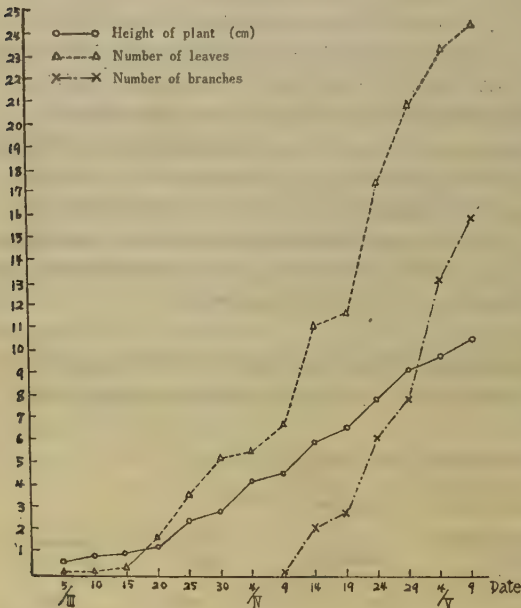



Fig. 1.　Growth Progress of Plant in Seed-bed

先づ草丈についてみるに発芽後15日間はその伸長が甚だ緩慢であり子葉が稍大形になる外は余り伸長は認められない．しかしこの間根部の伸長はいちじるしく続けられているようである．その頃本葉が始めて対生に発生し葉数はその後漸時増加して行く．その後の草丈の伸長は葉長の伸長によるものであつて未だ茎の発生は認められない．発芽後30日目頃より茎の発生が認められその後の茎の伸長がいちじるしい．特に苗床の終期近くなると益々いちじるしくなるのが認められる．分枝は40日頃より葉腋に発しはじめ爾後増加して行くのが認められる．4月上旬頃密生した箇所は間引をする必要がある．病害としては3月上，中旬の頃気温の上昇と共に特に多湿の場合又は密生した箇所に多く発生する一種の病害が認められることがある．病徴は先づ子葉に黒い斑点を生じ1日ほどして茎と根の境界の所が黒くおかされ腐り苗が倒れ枯死する．その伝染は相当早く被害株を中心として円形に拡大されて行く．その予防及び防除には4～8斗式ボルドー合剤が最もよく，この撒布により完全に防止することが出来る．苗床期間の終期即ち仮植苗の生育状況は第2表の通りである．

Table 2.　Seedlings at the End of Stage of Seed Bed.

Weight of plant (g)	Height of plant (cm)	Number of leaves	Number of branches	Length of root (cm)	Number of lateral roots
2.95	10.25	24.2	14.8	17.77	23.2

2.　**仮植圃**　仮植圃の期間中の気象状況は第3表の通りである．

Table 3. Cheif Climatic Factors during the Provisionally Transplanted Field.

Year	Month		Air temperature					Rainfall Total	Number of days with frost
			Mean (c°)	Maximum		Minimum		(mm)	(day)
				Mean (c°)	Absolute (c°)	Mean (c°)	Absolute (c°)		
1955	Jun.	E	20.9	25.2	27.3	16.6	11.8	44.3	0
		M	23.4	27.1	29.5	19.7	16.1	125.7	0
		L	25.9	29.5	33.0	22.3	19.0	2.8	0
		A	23.4	27.3	33.0	18.6	11.8	172.8	0
	Jul.	E	26.8	29.7	31.3	23.4	21.8	80.0	0
		M	27.2	32.0	33.2	22.4	20.0	12.2	0
		L	26.9	30.7	33.7	23.6	20.8	118.5	0
		A	27.0	30.8	33.7	23.2	20.0	210.7	0
	Aug.	E	28.1	32.7	34.2	23.5	21.2	22.6	0
		M	27.1	32.1	34.6	22.1	19.2	1.5	0
		L	26.1	30.5	32.5	22.2	19.6	101.2	0
		A	27.1	31.5	34.6	22.6	19.2	125.3	0
	Sep.	E	25.0	30.1	32.2	19.9	17.0	2.3	0
		M	24.9	29.7	32.6	20.8	15.5	9.6	0
		L	23.4	28.1	30.7	18.8	15.6	23.7	0
		A	24.4	29.3	32.6	19.6	15.5	35.6	0
	Oct.	E	21.1	24.3	29.0	18.0	11.9	97.5	0
		M	19.1	23.4	26.0	14.7	11.0	209.2	0
		L	18.2	22.1	24.5	14.1	10.0	65.4	0
		A	19.4	23.3	29.0	15.6	10.0	372.1	0

E. Early 10 days.　M. Middle 10 days.　L. Last 10 days　A. Average.

仮植圃は排水良好な肥沃な土地をえらび幅５尺の短冊型平畦とする．肥料は基肥として坪当堆肥２貫，過燐酸石灰67匁，硫酸加里17匁，石灰200匁を施用し予め耕起前に入れておく．仮植の方法は畦に深く溝を掘り充分灌水し５寸間隔に植付ける．１列植終ると更に５寸距離を取り次の作条を作り同様に植付ける．植付完了後は長い苗は摘心しておく．植付後活着まで約10日間は余り土地が乾燥する場合は充分灌水する必要がある．その後の管理としては随時少なくとも１ヶ月に１回摘心を励行し，草高低く株張のよい頑丈な苗に仕立て上げる．即ち根際より分枝した盃状形の苗に仕立てあげるのである．追肥は坪当過燐酸石灰10匁，硫酸加里５匁を夫々６月中旬，７月中旬，９月中旬の３回施用した．本圃１反歩に対し仮植圃は50坪の面積を要し苗は枯死率を見込んで約6,000本を要する．植付後の生育状況は第２図に示す通りである．

植付直後は萎凋甚だしく下葉は枯死し約10日頃より活着を示し凋落より立直り頂芽が伸長しはじめる．この頃には地下部に於ては新根の発生が認められる．その後草丈の伸長と共に随時摘心を行い草高は８月終りを最高とし爾後の摘心により低く仕立られてゆく．分枝数は仮植時は平均６本であるが漸時増加し定植期には最高に達するがその増加は甚だ緩慢である．次に枯死率についてみるに活着不良のために枯死したと考えられるもの稍多く８～９％を示し，その後の増加は殆んど認められないが８月初旬に急激に増加し17～18％に達し爾後定植期まで殆んど増加は認められない．仮植期間中の枯死率は平均約２割を見込んでおく必要があり時には非常に多くなる場合もあり本栽培上の最も難点となつている．仮植圃の終期即ち本圃定植期に於ける苗の生育状況は第４表の通りである．

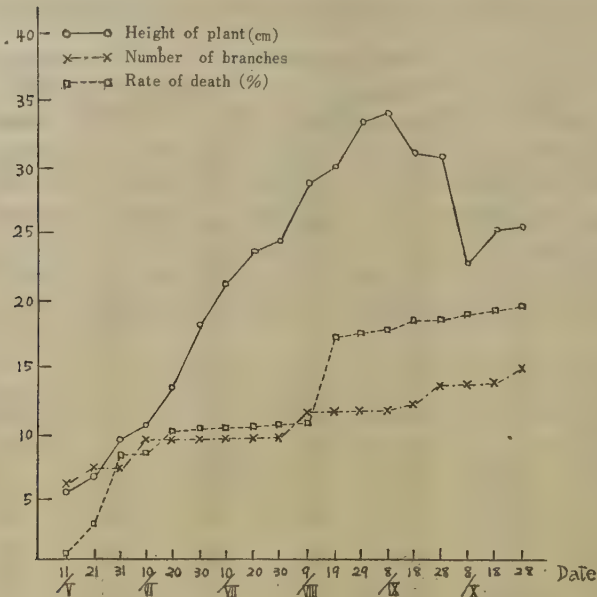



Fig 2. Growth Progress of Plant in Provisionally Transplanted Field.

Table 4. Seedlings at the End of Stage of Provisionally Transplanted Field

Weight of plant (g)	Height of plant (cm)	Diameter of main stem at 3cm height (cm)	Number of branches	Number of buds	Length of bud (cm)	Number of lateral roots	Length of root (cm)
17.2	23.7	0.69	14.0	118.1	4.2	10.7	27.4

3. 本　圃　本圃の期間中の気象状況は第５表に示す通りである.

Table 5. Chief Climatic Factors during the Main Field.

Year	Month		Air temperature					Rain fall total	Number of days with Frost
			Mean	Maximum		Miuimum			
				Mean	Absolute	Mean	Absolute		
			(c°)	(c°)	(c°)	(c°)	(c°)	(mm)	(day)
1955	Nov.	E	12.4	18.1	21.3	6.7	2.2	0.0	1
		M	12.3	18.1	22.5	6.5	2.5	87.3	2
		L	13.4	18.2	21.6	8.0	5.5	14.5	1
		A	12.7	18.1	22.5	7.3	2.2	101.8	4
	Dec.	E	10.5	15.7	18.2	5.4	1.0	0.0	3
		M	9.8	14.9	19.3	4.6	2.0	35.0	4
		L	9.6	13.0	15.4	6.0	2.5	0.0	2
		A	9.9	14.5	19.3	5.4	1.0	35.0	9
	Jan.	E	6.7	10.1	15.4	3.4	−4.2	38.3	5
		M	6.3	10.9	13.7	1.8	−1.7	0.3	4
		L	6.0	10.3	14.6	1.8	−2.4	34.1	2
		A	6.4	10.4	15.4	2.3	−4.2	72.7	11

Year	Month		Air temperature Mean (c°)	Maximum Mean (c°)	Maximum Abslute (c°)	Miuimum Mean (c°)	Miuimum Absolute (c°)	Rain fall total (mm)	Number of days With Frost (day)
1956	Feb.	E	6.6	11.0	15.7	2.2	−3.3	22.7	1
		M	5.9	10.8	16.8	1.3	−3.5	40.9	5
		L	6.1	10.7	13.8	1.5	−2.5	63.0	2
		A	6.1	10.7	16.8	1.6	−3.5	126.6	8
	Mar.	E	6.6	11.3	16.7	1.8	−1.7	44.8	2
		M	11.9	17.1	23.7	6.8	−1.4	42.3	2
		L	13.3	17.6	20.8	9.0	1.5	65.5	0
		A	10.7	15.8	23.7	6.0	−1.7	157.6	4
	Apr.	E	11.1	16.0	20.3	6.1	1.4	22.3	0
		M	17.4	22.8	25.7	12.0	6.2	157.6	0
		L	17.0	22.0	23.4	11.9	3.5	42.2	0
		A	15.0	20.3	25.7	10.0	1.4	222.1	0
	May.	E	18.1	22.8	25.3	13.4	10.0	44.3	0
		M	17.1	21.6	25.3	12.7	7.5	125.7	0
		L	20.7	25.2	29.4	16.1	12.5	2.8	0
		A	18.7	23.3	29.4	14.1	7.5	172.8	0
	Jun.	E	23.2	27.7	32.1	18.7	15.3	80.3	0
		M	23.7	28.7	32.3	18.8	13.5	12.2	0
		L	23.8	27.5	30.3	20.0	15.6	118.5	0
		A	23.6	28.0	32.3	19.2	13.5	211.0	0

E. Early 10 days.　M. Middle 10 days.　L. Last 10 days.　A. Average

圃場はなるべく排水良好な地をえらび土質は肥沃な壌土又は砂壌土が適している．水稲刈取後圃場は予め起耕し畦巾４尺，高さ５～８寸の高畦とする．畑作の場合５～３寸の高畦とする．石灰及び堆肥は起耕前に全面に撒布しておき鋤きこむ．畦には２条の溝を掘り基肥を施す．定植は予め仮植圃より掘取りたる苗の根を乾燥せぬよう注意しなるべく深く植付け根際まで覆土する．１畦２条植，株間１尺の千鳥植とする．反当5,400本植となる．定植の時期は早いほどよいが前作物の関係もあり10月下旬～11月上旬が適当である．植付は必ず降雨の後に行い晴天の場合は植付直後灌水が必要である．肥料は第６表の通りである．

Table 6.　Manures of Main Field. (per Tan*)

Name of manure	Total weight (kan)	Rase manure (kan)	Topdressing Middle of Feb. (kan)	Topdressing Early of Mar. (kan)	Topdressing Middle of Apr. (kan)	Weight of element Nitrogen (kan)	Weight of element Phosphoric acid (kan)	Weight of element Potassium (kan)**
Compost	300	300				1.350	0.690	1.440
Lime	30	30						
Rapecake	8	8				0.400	0.200	0.100
Ammonium sulphate	8	2		3	3	1.640		
Super phosphate lime	13	5	4		4		2.015	
Potassium sulphate	4	2		2				1.440
Total						3.390	2.905	2.980

* Tan is equivalent to about 0.1 hectare.

**Kan is equivalent to 3.75kg.

11月 10日定植したが活着は良好で殆んど枯死したものを認めなかつた．活着率は98%であつた．定植後約2週間で新根の発生するのが認められる．地上部の生育状況は第3図の通りである．

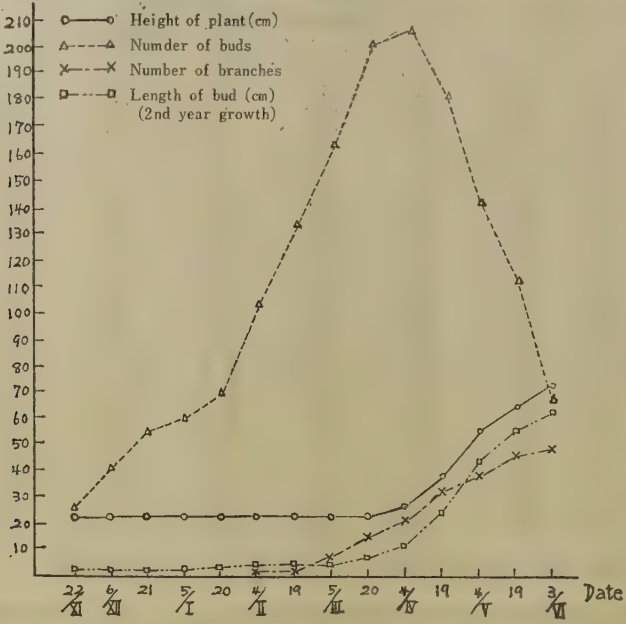



Fig 3. Growth Progress of Plant in Main Field.

12月中旬頃徒長した茎．花蕾を着生した枝等を除去刈込み株揃を行う．3月上旬までは地上部の生育は殆んど休止の状態となり草丈芽長の伸長は全くみられない．しかし芽数は漸時増加し2月上旬頃より急激に増加を示し3月下旬～4月上旬最大に達し再後減少して行く．新芽の伸長は3月中旬頃に始まり4月上旬頃より急にその伸長度を増し収穫期頃最大に達伸長する芽数（分枝数）も増加し収穫期に於て最大となる．4月下旬頃より伸長した枝に更分に第二次分枝が発する．生しその伸長が5月上旬頃より旺盛となり収穫期まで続く．この第二次分枝は収量の増加に非常に役立つものと考えられる．5月上旬頃より草丈分枝等の生長旺盛になるに伴ない下葉が枯れ上つて来て減収を来たすことが多い．これも一種の病害と考えられこの防止予防には4斗式ボルドー合剤が最も有効でその撒布により完全に防止することが出来る．5月29日収穫適期と判定し抜取り収穫乾燥したが収量及び生育状況は第7表の通りである．

Table 7. Yield of Crops in Main Field.

Height of plant (cm)	Length of stem (cm)	Number of stems	Number of useful stems	Length of root (cm)	Number of lateral roots	Per. Tan* Fresh weight of whole crop (kg)	Air-dried Weight: Whole crop (kg)	Air-dried Weight: Useful part (kg)	Air-dried Weight: Leaves (kg)	Air-dried Weight: Stems (kg)	Air-dried Weight: Unuse-fulpart (kg)	Santonin content (%)	Weight of santonin (kg)
72.2	63.1	69.7	49.8	33.9	11.3	2,070.2	631.1	387.1	176.5	210.6	244.0	1,279	4,951

* Tan is equivalent to about 0.1 hectare.

乾燥は収穫当日は圃場にならべて日乾し直ちに屋内にて張りめぐらした針金に根をひつかけてつるし風乾する．風乾中は雨及び日光にあてないよう注意が必要である．乾燥完了の程度は茎が軽く折れる程度を以つてする．この程度まで乾燥すると水分は15%以下になつている．約2週間を要する．乾燥終了後葉のついていない茎の基部及び根の部分は押切で切捨て切口を揃えて調製する．調製の終つた製品は水分が15%以下であること，かびが生じていないこと，切口より緑白色の葉が着生していること，変色していないこと，着蕾していないこと等が品質のよい製品の条件となつている．包装は普通莚でまき20kg俵とする，

総　　括

クラムヨモギの水田裏作法について試験したがこの栽培法は苗床，仮植圃，本圃の3段階よりなり播種より収穫乾燥調製まで1年5ヶ月を要する．先づ播種期について考えるに苗床期間2ヶ月を要し，仮植期は梅雨期より少くとも1ヶ月早くし充分活着せしめておかないと枯死率が非常に多くなる．おそくとも5月上旬までに行う必要がありこれらを考慮して2月中旬とした．2月中旬では気温は発芽の適温より稍低いが発芽の期間が稍長く要するだけで発芽は極めて良好である．且当地方では自然落下した種子が発芽して来るのは3月初旬でありこれを以つてしても播種期の2月中旬は適期であると考えられる．秋播法も考えられるがこの植物の種子成熟期は12月下旬であり種子は高温の夏期を経過し貯蔵しなければならないので発芽力はいちじるしく減退する．発芽後は気温の低下により生育は進展せず不良である欠点がある．播種法は苗床を設置し撒播を採用したが，普通圃場に畦立し簡単に考案した播種器により条，点播する方法もある．この植物は耕土の深い圃場では主根のみが長く伸長し側根の発生は殆んどみない．それ故仮植の場合凋落はげしく活着率を悪くする．この欠点を補うため断根し側根の発達をうながし良苗を得る方法が案出された．相当の成績を得ているが断根の時期，深さ等目下検討中である．この方法は苗床設置の労力が省けること，種子量が少なくてすむこと．間引その他の管理が便利であること等の利点があるが断根による生育遅延が見のがすことの出来ない欠点である．仮植期間中に枯死率が稍高くなるのが本栽培法の最も難点とされている．特に梅雨時期及び8月の酷暑の候には枯死率が高くなつている．このため仮植圃は排水良好の場所をえらび敷藁を行い降雨により苗が泥袴をかぶることを防ぎ又生育のまだ進まない内は除草を励行すること等特に注意が必要である．又生育の進むにつれて摘心刈込を励行し草高低く盃状形に仕立ることが必要である．特に9月下旬頃より花蕾が着生し生殖成長に移行するが出来得るかぎり花蕾の着生した枝を剪除し生殖成長を抑制し苗の活力を保持せしめるようにせねばならない．本圃に於ては肥料が最も重要な問題である．元来この植物は非常に多肥にたえる植物であり多肥ほど収量が多い．肥料要素量については全草を収穫の対象とする作物であり他の種実を収穫する作物と稍異なり窒素量を多く要し反当窒素，燐酸，加里夫々3貫，3貫，3貫が適量でないかと考えられる．なお4月上旬より急激な生育の伸展を見るのでその施用の時期等も考慮を要する問題である．肥料の量，種類，比率，施用時期等今後の研究にまつことが非常に多い．収穫期につては次作物の作付により制約され5月終りより6月初めとしているがこの時期は次作物の制約がなくとも適期であると考えられる．即ちこの時期よりおくれると植物全体の重量は増加して来るが有用部の比率が減少して来る．又有用部に於てもこの時期は葉の茎に対する比率が最大である．梅雨期に入り乾燥が不便になつて来る．サントニン含量はその後稍増加して来るが反当サントニン量が最大であると推定される．本試験に於ては草収量反当380kgをあげているが農家の実際の栽培では確的な資料を欠くが平均250～300kgの線であると推察される．これだけ収量をあげ得るとすれば大麦，小麦，菜種等より相当有利な裏作物であると云うことが出来る．しかし特殊な栽培法を行うため農家の経営上から考えて最高収量をあげるには1戸当り栽培面積は1反歩位が適当ではないかと考察される．本栽培法には未だ改良すべき点，更に研究を要する事項等多々あるがこれにより西日本に於けるクラムヨモギの栽培は一応確立されたものと考えられる．

摘　　要

著者は1955年，56年の両年にわたつてクラムヨモギの水田裏作について試験を行つた．この栽培法は苗床期間，仮植期間及び本圃期間の3段階よりなる．即ち2月中旬播種し，5月上旬仮植，11月上旬定植し翌年5月終り又は6月初めに収穫する．播種より収穫．乾燥完了まで1年5ヶ月を要する．調査は主として作物の生育状況及び収量について行われた．調査の結果は次の通りである．

1. 苗床に於ける生育状況は第1図に示す通りであり，終期に於ける苗は重量2.95g，草高10.25cmであつた．
2. 仮植圃に於ける生育状況は第2図に示す通りであり，終期に於ける苗は重量17.2g，草高23.7cmであつた．
3. 本圃に於ける生育は第3図に示す通りであり，収穫量は反当385kgであつた，
4. 農家に於ける平均反当収量は250～300kgの線にあると見られる．それ故大麦，小麦，菜種等の裏作物より相当有利な裏作物である．
5. 本栽培方法により西日本に於けるクラムヨモギの栽培は一応確立されたと考えられる．

文　　献

1) 川谷豊彦，藤田早苗之助，大野忠郎：薬雑，72. 37～41 (1952).
2) 川谷豊彦，藤田早苗之助，大野忠郎：薬雑，72. 1003～1006 (1952).
3) 川谷豊彦，藤田早苗之助，大野忠郎：薬雑，73. 886～892 (1953).
4) 吉田豊治，農及園，30. 1474～1476 (1955).

Summary

Studies were made on the cultivation of Kuramuyomogi (*Artemisia Kurramensis* QAZILBASH) as a winter crop in rice field in 1955 and in 1956. The cultivation is divided into three stages, namely the seed bed, the provisionally transplanted field, and the main field (rice field). Seeds were sown in seed bed at the middle of February, and seedlings were provisionally transplanted in field at the early of May, and were mainly transplanted in main field at the early of November. Crops were harvested at the end of May or the beginning of June of next year. The period of cultivation from sowing to harvest and drying was taken for one year and five months. The investigations were carried out cheifly on the growth and the yield of crops in each stage. Results obtained are summarized as follows.

1. The growth progress of seedlings in seed bed is shown in Fig 1. and at the end of stage the fresh weight of seedling was 2.95g and the height of seedling was 10.25cm.

2. The growth progress of seedlings in provisonally transplanted field is shown in Fig 2. and at the end of stage the fresh weight of seedling was 17.2g, and the height of seedling was 23.7cm.

3. The growth progress of crops in main field is shown in Fig 3, and at the harvest the yield of useful crops was 385 kg per tan on air dry basis.

4. The average yield of farmers seems to lie in the range of 250～300 kg, therefore, this crop is more economically profitable than other winter crops, snch as wheat, barley and rape.

5. It is thought that, according to the present studies, the cultivation of Kuramuyomogi in west Japan is practically established.

Received June 18, 1957

ヘパリン日局標準品力価の検定について

長沢佳熊，中山豪一，芹沢　淳

On the Assay of the Heparin Reference Standard of Japanese Pharmacopoeia (1955)

Kakuma NAGASAWA, Goichi NAKAYAMA and Jun SERIZAWA

ヘパリンの検定には通例次の4種が用いられている．

1) 新鮮な牛の全血液を用いる方法[1]．
2) クエン酸処理牛血漿とトロンビンを用いる方法[2]．
3) クエン酸処理羊血漿と塩化カルシウムを用いる方法[3),4)]（米局XIV，XV）．
4) 硫酸ナトリウム処理牛血液とトロンボキナーゼを用いる方法[5),6),7)]（英局VIII，国薬II）．

1953年Jorpes等[8)]はこれら4種の方法の信頼性について詳細に報告している．氏等によると1）の方法は血液を試験管に充満する操作に熟練を要し，この操作，技術が検定精度に影響する．2）の方法は3）の方法と共に血漿を作る条件がむづかしく，低温を必要とする困難があるが，長期間血漿の保存がきき，検定結果のバラツキが少なく，最もすぐれた方法であつて，1）と2）の結果がよく一致するという．3）は血漿の凝固の判定が非常にむずかしいので検定技術に熟練を要し，又得た検定結果のバラツキが大きく1），2）の方法に比べ低い値を得るという．同様な検定操作を用いる米局XVでは，〔全く凝固しない用量〕と，〔全く凝固する用量〕との差が非常に小さい(すなわち用量・反応関係が非常に急である）ためと，凝固の判定に主観が入るため，力価の測定に熟練を要するので，移動平均(Moving average)を用いている．4）の方法は準備，操作が簡単で，検定時間も短かく確実性があり，その上得た結果を統計的に処置できるため信頼性が強いという．米局は色々な欠点が多いので，最近PRITCHARD[9)]は血漿の製法，加えるカルシウムの濃度と用量を変え，そしてあらかじめヘパリンを含む血漿の混合液を予製しておき，7用量を用いて作つた標準曲線から力価を求め確実性の高い結果を得る改良法を報告している．又数匹の羊を用い頸静脈からヘパリンを注入後正確に4分で採血し，凝固時間をグラフにプロットして力価を求める in vivo method[10)]も報告されておる．この方法は血液凝固素に含まれるすべての要素を含んでいるので誤差を生じない理想的な方法であるという．

著者等は，英局VIII，国薬IIに採用されている硫酸ナトリウム処理牛血液を用いる方法によつて，日局ヘパリン標準品の検定を行つたので報告する．

実験方法　（1）牛血液の採集：採血は芝浦屠場で撲殺直後の牛頸静脈血250 ccを，あらかじめ10％無水硫酸ナトリウム水溶液（英局では7％無水硫酸ナトリウム水溶液を1：5の割合に用いているが，我々の行つた実験ではこの処方では凝固し，使用不能であつた.）50 ccを入れた内容300 ccの広口ビンに加え（10％硫酸ナトリウムとの比1：5）密栓し（この際瓶の上部になるべく空間のないようにする.），2～3回上下に振動してよく混合し，なるべく静かに実験室に運び直ちに約0°～1°の氷室に保存する．（採血後氷室内に保存する迄に要する時間は大約90分以内であつた）．氷室内に密栓して保存すれば約10日間は殆んど凝固物を生じなかつた．保存中に細かい凝固物を生じた場合には実験の直前にガーゼで沪過して用いた．

（2）アセトン乾燥脳粉末：血管や他の組織を除いた新鮮な牛大脳を細かく切断し，アセトン中に入れてあらかじめ脱水した後，乳鉢中でできるだけ粉砕し，その重量30 gにつきアセトン75 ccの割合に加えて完全に脱水する．吸引沪過し，2時間，37°で乾燥し，アセトンを完全に除く．得た乾燥物を更に乳鉢中で粉末とし，篩過して得た黄白色の粉末をデシケータ（五酸化燐）中に保存する．

（3）トロンボキナーゼ抽出液：アセトン乾燥脳粉末（この粉末は製造後かなりの時間が経過していたので効力が相当落ちていたと思われる）2 gを乳鉢にとり，水小量を加えて泥状とし，よくすりつぶし，蒸留水を加えて40 ccとする．50°の水浴中15分間時々ふりまぜながら抽出し，冷後10分間遠心分離（3 000回転）し，上部の白濁した乳状の液を用いた．

（4） ヘパリン標準液及び検液の調製法：標準品として国際標準品を用い，検体として日本薬局方ヘパリン標準品を用いた．標準品は精密に秤量し，蒸留水で1cc中100単位を含むように溶かして標準原液とし，共栓三角フラスコ中に密栓し，大約0°の氷室内に保存した．検体も標準品とほぼ同単位と思われる濃度に蒸留水に溶かし，検体原液とし，同様に保存した．両原液は試験当日蒸留水で適当にうすめて標準液及び検液とした．

（5） 検定方法：ヘパリンの濃度（用量）の対数と凝固時間の対数が直線関係を表わす主旨に基き標準液，検液のそれぞれ3用量ずつを用いて3－3用量検定を行う．高用量は約1.3～1.0単位とし，用量比は1.25（80%）で行つた．すなわち蒸留水で適当にうすめた標準液3種及び検液3種の各1ccを，予めトロンボキナーゼ抽出液0.2ccを入れた1.3×15cmの共栓パイレックス製試験管に加え，得た混液に硫酸塩加牛血液1ccずつをメスピペット（先端の孔の大きな流出の早い特製のピペットがよく，できるだけ流速を一定とする）で加え，同時に秒時計で時間を記録し，2～3回傾斜流動して完全に混合する．（この操作で試験管壁が均等に混合液で浸される．血液を混合した後15秒ごとに管を静かに傾斜して血液の流動性の変化を観察し，上下に管を転倒したとき，管底に附着した凝固物が落下しないときをもつて測定の終末点とする．もし管を転倒した時，管底の凝固物が落下した場合は正確な検定結果を得難たく，この回の6ケの測定は検定結果に入れない．ただし管を転倒した際わずかな赤色滲出液が管壁に沿つて流下するものは凝固したものとして判定した．また凝固時間は高用量の場合に必ず12分以内となるようにヘパリン濃度，トロンボキナーゼ用量を適当に変えてあらかじめ調整する．もし12分以上の凝固時間を要したならば，ヘパリン濃度と凝固時間間に比例関係が成立しないため，検定結果の信頼性が小さくなる．かくして標準品，検体共に3種ずつ6個の測定を4回くりかえし，1回の検定とする．

この検定法は温度の影響がないが，著者等は主として22°の恒温室で行つた．

（6） 計算：常法により力価及びその信頼限界を求め，更に合計11回の検定結果についてはBliss[11]の方法に従つて加重平均（Weighted mean）を求め，この価を日局ヘパリン標準品の力価とした．

実験結果　著者等は，合計11回の検定を行つた．その一例を示す．

昭和31年8月21日採血，8月23日実験，室温22°（恒温室）トロンボキナーゼ量0.2cc.

Table 1. Clotting Time in Minute

Run	Standard Heparin			Unknown Heparin (J. P. Standard)		
	S_1 0.768 u/cc	S_2 0.96 u/cc	S_3 1.2 u/cc	T_1 0.0065 mg/cc	T_2 0.00812 mg/cc	T_3 0.01015 mg/cc
1	3 1/2	4 3/4	7 1/2	4	5 3/4	6 3/4
2	3 3/4	5	7 1/4	4	4 1/4	7 1/4
3	4 1/4	5 1/4	7 1/4	3 3/4	5 1/2	6 3/4
4	3 3/4	5 1/4	7	3 1/2	5 1/4	7 1/2

Table 1の凝固時間を対数に変換し，Table 2に示す．Table 2の資料の分散分析及び計算法をTable 3及び4に示す．

Table 2. Log Clotting Time for Dose

Run	S_1	S_2	S_3	T_1	T_2	T_3	Total
1	0.54	0.68	0.88	0.60	0.76	0.83	4.29
2	0.57	0.70	0.86	0.60	0.63	0.86	4.22
3	0.63	0.72	0.86	0.57	0.74	0.83	4.35
4	0.57	0.72	0.85	0.54	0.72	0.88	4.28
Total (Y_P)	2.31	2.82	3.45	2.31	2.85	3.40	17.14

Table 3. Analysis of Variance for the Data of Table 2

Source	Sum of Squares	Correction Term	Reduced Sum of Squares	D. F.	Variance
Total	12.5714	12.2408	0.3306	23	
Between runs	12.2422	12.2408	0.0014	3	0.0005
Between doses	12.5524	12.2408	0.3116	5	0.0613
Residual			0.0176	15	$0.0012=S^2$

Table 4. Calculation for tbe Data of Table 2

Treatment Effect	S_1	S_2	S_3	T_1	T_2	T_3	Nx^2	$(NSxY_P)$	$\frac{S^2NY_P}{Nx^2}$
Samples	−1	−1	−1	1	1	1	24	−0.02=T	
Slope	−1	0	1	−1	0	1	16=P	2.23=Q	
Linearity of Curve for Standard	1	−2	1				24	0.12	0.0006 A_1
Linearity of Curve for Unknowns				1	−2	1	24	0.01	0.000004 A_2
Parallelism of Lines	1	0	−1	−1	0	1	16	−0.05	0.0002 A_3
Total, Yp	2.31	2.82	3.45	2.31	2.85	3.40		$\frac{A_1+A_2+A_3}{3}=A=0.000268$	

$M=1.33TI/Q=-0.0012$, $R=0.9972$, $S^2\times 4.54=0.0054$

Potency = 117.9 u/mg

$C=Q^2/[Q^2-t^2s^2p]=4.9729/(4.9729-0.0872)=1.0178$

Log fiducial limits of error : $CM\pm\sqrt{(C-1)(0.02507+CM^2)}$

$=-0.0012\pm\sqrt{0.0178\times 0.02507}=-0.0012\pm 0.0211=-0.0223\sim 0.0199$

Fiducial limits of error = 0.9199～1.047

Fiducial limits of error % = 95.3～105.0%

Table 4. Summerized Results for the 11 Assays

Run	M	u/mg	Fiducial Limits of Error, %	λ	S_M	W
1	0.0730	118.3	93.3～106.5	0.031	0.0131	5 814
2	0.0619	115.3	95.7～104.1	0.020	0.0086	13 514
3	0.1031	126.8	94.3～105.9	0.025	0.0102	9 615
4	0.0873	122.3	95.2～105.2	0.024	0.0098	10 417
5	0.0866	122.1	94.8～105.3	0.026	0.0106	8 929
6	0.0647	116.1	94.9～105.1	0.025	0.0104	9 259
7	0.0638	115.8	86.8～114.2	0.043	0.0176	3 226
8	0.0699	117.4	94.7～105.6	0.027	0.0110	8 264
9	0.0715	117.9	95.3～105.0	0.024	0.0098	10 417
10	0.0634	115.7	96.1～104.0	0.019	0.0078	16 393
11	0.0656	116.3	95.4～104.6	0.023	0.0094	11 364

11回の検定結果の平均値を求めると次のようになる.

各Mの等質性試験 (χ^2 検定)

$$[W_1M^2]=591.6401-\frac{61\ 575\ 409}{107\ 212}=17.3069$$

$$k=10,\qquad \bar{n}=13.909$$

$$\chi^2_M=10+0.8761\left(\frac{17.3069}{13.909}\times 11.909-10\right)=14.2214<\chi^2_{(10)}=18.307$$

各Mについて等質性が認められるので, Mの平均値を求める.

$$\bar{M}=\frac{S\ (W_1M)}{S\ (W_1)}=0.0732,\quad \bar{R}=1.184$$

∴ Mean Potency : 118.4 u/mg

$$S_{\bar{M}}=\sqrt{\frac{13.909\times\{11\times(13.909-2)\}+8}{(13.909-2)\{11\times(13.909-4)+12\}\times 107\ 212}}=0.0035$$

$$\text{D. F. in } S_{\bar{M}}=\frac{13.909\times 0.001342^2}{0.000000210722}=118.9,\qquad t=1.98$$

Log fiducial limits of error $=0.0732\pm1.98\times0.0035=0.0663\sim0.0801$

Fiducial limits of error % $=98.3\sim101.5$

む す び

国薬, 英局に収載されている方法に準じて日局へパリン標準品の検定を行つたところ, 誤差の信頼限界 98.3～101.5%で, 1 mg 当り 118.4 単位の効力を有することを知つた.

この研究に対し, 血液採集に便宜を与えられた東京都松本技師に謝意を表する.

文 献

1) Jalling, Jorpes, Linden, : Quart. *1. Pharm. Pharmacol.*, 19, 96. (1946).

2) Studer, Winterstein, : *Herv. Physiol. Pharmacol.* Acta., 9, 6 (1950).

3) Mangieri, *J. Lab. Clin. Med.*, 32, 901 (1947).

4) Pharmacopeia of United States of America, XV, 317.

5) Adams, S. S., : *J. Pharm. Pharmacol.*, 2, 836 (1950).

6) 国民医薬品集, II, 324, (厚生省版)

7) British, Pharmacopoeia, VIII, 833.

8) Jorpes, J. : *J. Pharm. Pharmacol.*, 5, 1031, (1953).

9) Pritchard, J. : *J. Pharm. Pharmacol.*, 8, 523, (1956).

10) Jorpes, J. E., Blomback, M., Blombäck, B., : *J. Pharm. Pharmacol.*, 6, 694, (1954).

11) Bliss, C. I., : The Statistics of Bioassay, 576～580.

Summary

The potency of the heparin reference standard of the Japanese Pharmacopoeia was compared with hat of the international heparin standard by the British Pharmacopoeia Ⅷ method, and shown to be 118.4 units per mg.

Received June 18, 1957.

エピレナミンの検定（第3報*）
脳髄破壊白鼠によるエピレナミンの2-2用量検定**

長沢佳熊，中山豪一，芹沢　淳

On the Assay of Epinephrine No. III.
Two and Two Dose Assay Using Spinal Rat.

Kakuma NAGASAWA, Goichi NAKAYAMA and Jun SERIZAWA

まえがき　エピレナミンの生物学的検定法は脳髄破壊猫法[1]，アトロピン処置麻酔犬法[2]，などが一般的である．第1報[3]第2報[4]でアトロピン処置麻酔猫法，脳髄破壊猫法，アトロピン処置麻酔犬法について報告した．

最近Somers[5]は神経節遮断剤Hexamethonium Bromideを麻酔猫に静脈注射し，血圧を持続的に降下させてエピレナミンの検定を行つている．近年白鼠血圧を用いる昇圧物質の検定が行われているが[6]，[7]，[8]，著者等の一人中山[9]は脳髄破壊白鼠を作製し，パソプレシンの用量・反応線を検討し，2-2用量検定を行い，従来の犬，猫法にくらべ非常に感度もよく操作も簡単で経済的にも安価な精度の高い方法であると報告した．著者等はエピレナミンの生物学的検定法にこの方法を適用し，まずその用量・反応関係を検討し，直線性の認められる用量範囲で2-2用量検定を行い，次のような満足すべき結果を得たので報告する．

(1)　感度がよいため，非常に微量（約0.4 γ）のエピレナミンを定量することができる．これは従来の犬，猫法にくらべ5～10倍の感度（猫では普通1～2γ，犬では2～5γ）の増大であり，用量比（高用量/低用量）も犬，猫法の2.0に対して1.2でよく，このことは用量の差に対するそれぞれの反応の差が大きいこと，すなわち用量・反応線の勾配の大きいことを意味する．従つて検定精度をよくすることが容易である（Table 1, 2, 3, 4, 5, 6）．

(2)　1匹の白鼠で数十回に亘り注射を繰返すことができ，感度の低下や血圧基線の変化も殆ど見られないので，1日にエピレナミン製品5～6検体を検定できる．又1検体の検定に要する時間は2～3時間である．

(3)　この方法は経済的にも安価であり，動物の飼育，供給等も犬，猫にくらべ非常に容易である．

(4)　2-2用量検定で，わずか8回注射を繰返すだけで信頼限界（P＝0.95）80～125％以内で力価比が得られる．16回注射を繰返せば信頼限界（P＝0.95）90～111％以内で力価比を求めることができる．

比較のためHexamethonium Bromide処置白鼠を用いるエピレナミンの検定をも行つた．Hexamethonium Bromide処置白鼠についてはすでに中山[9]がパソプレシンの定量の際に報告しているように，この薬品の投与のみでは，血圧の変動を完全に防ぎ，しかも長時間一定の低血圧を保つことは困難であるので，検定誤差が大きかつた．これに比較して著者等の方法は遥かに優れている．

又米局XVでは化学的定量法として塩酸エピレナミン30 mgを用い，トリアセテートを作り，その旋光度を測つている．又日局VIではエピレナミン約25 γの稀塩化第二鉄試液による呈色反応により定量に代えているが，著者等の方法はこれら化学的方法に比し，比較的短時間内に微量のエピレナミンを精度よく定量できる利点がある．

実験方法

(1)　脳髄破壊白鼠の作製法：生後約6ヶ月，体重250～350 g（平均270 g）の健康な雄白鼠（生後日数の多い白鼠は感度悪く，又多数回の注射に耐えない）にウレタン175 mg/100 gを皮下注射して麻酔し，中山の報告[9]に従つて作製した．

(2)　実験条件：温度22°～23°，湿度50～70％の恒温室で実験した．検体の注射量は0.1～0.15 cc，注射後生理食塩液0.3 ccで流し込んだ．注射間隔は3～5分（通例4分）である．

(3)　標準液及び検液の調製：標準液及び検液としていずれも国立衛生試験所エピレナミン標準品（1953）を用

*　第2報は衛生試 72，1（昭29）
**　日本薬学会昭和31年9月例会講演（1956）

い，0.1% 亜硫酸水素ナトリウムを含む生理食塩液で1000倍液を製し，用時生理食塩液で適当に稀釈して，稀標準液及び稀検液とした．

実験結果

(1) 脳髄破壊白鼠によるエピレナミンの用量・反応関係：検体として国立衛生試験所標準品を用い，脳髄破壊白鼠について，0.175 γ～0.6667 γ 間（用量比1.25）の用量・反応関係を求めた．得た結果をまとめて Table 1 に示す．Fig. 1 に血圧曲線例を示す．横軸に対数用量を，縦軸に血圧上昇値（mm Hg）を取り，Table 1 の資料をプロットして Fig. 2 に示す．

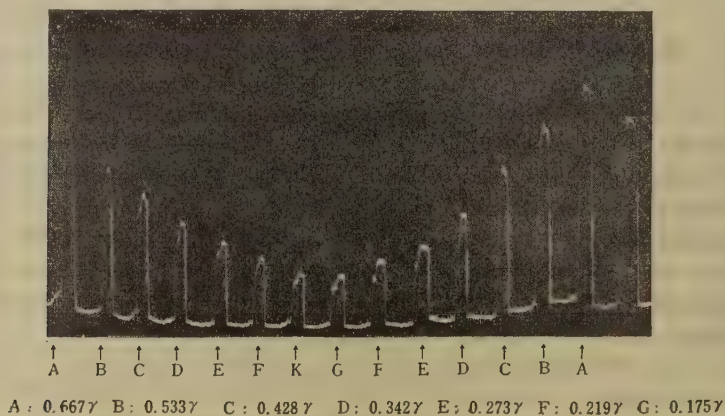



Fig. 1. Dose response relation curve

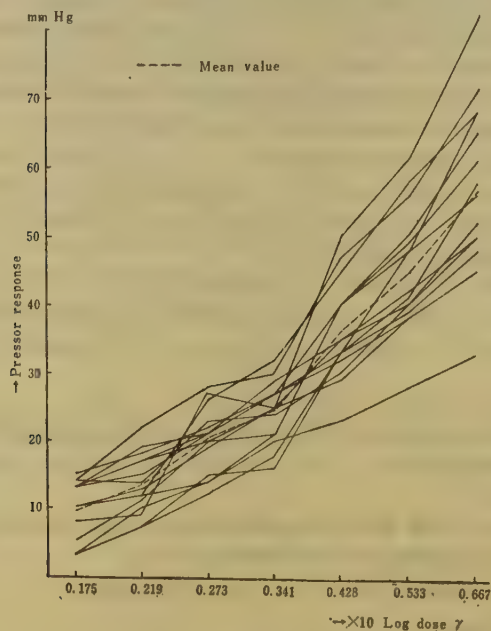



Fig. 2. Dose response relation

Fig.2 から0.342～0.667 γ 間に直線性が予想されるので，この部分につき，分散分析を行い Table 2 に示す．Table 2 から5 %の有意水準でこれら用量間で得られる血圧上昇値間に直線性が認められる．故に回帰方程式を算出し次式を得た．

$$Y=109.11x-33.38$$

Fig. 3 に回帰直線，及びその1 %と5 %有意水準での信頼限界を示す．

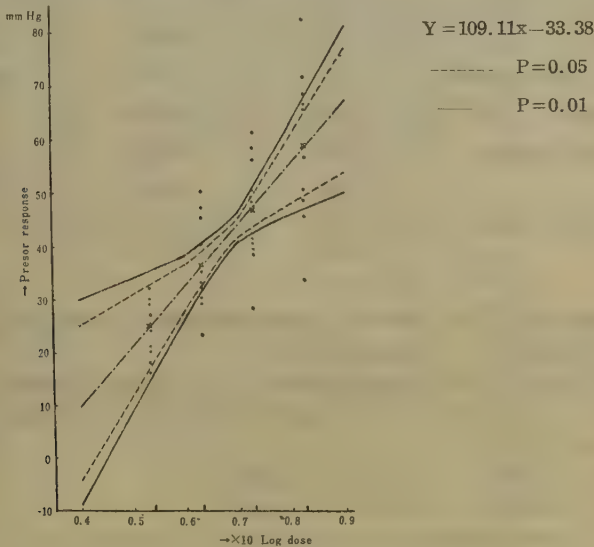



Fig. 3. Regression line and its fiducial limits (P=0.01 and 0.05)

Table 1. Dose-response relationship using spinal rat (dose ratio: 1 : 1.25)

Dose (γ)	0.175	0.219	0.273	0.342	0.428	0.533	0.667	No. of experiment
Response (mm Hg)	14	22	28	30	47	56	71	144
	10	12	26	32	45	58	68	
	8	9	27	25	50	61	82	
	10	13	19	25	29	38	45	145
	14	14	23	24	30	40	50	
	15	18	22	27	33	39	48	
	13	17	20	25	35	40	52	
	5	11	20	21	40	50	65	146
	3	7	15	16	33	48	68	
	3	10	14	21	40	49	61	
	3	7	12	18	33	41	58	
	10	12	14	20	23	28	33	147
	13	19	21	27	32	38	45	
	13	17	21	27	40	48	56	
	13	15	21	29	35	42	50	
Total	147	203	303	367	545	676	852	
No.of observation	15	15	15	15	15	15	15	
Mean	9.8	13.5	20.2	24.5	36.3	45.1	56.8	

Table 2. Analysis of variance for the data of Table 1

Adjustment for mean……………99 230.73

Nature of variation	d. f.	Sum of squares	Mean square	F
Regression	1	8 384.12		
Deviation from regression	2	28.07	14.04	0.45
Between doses	3	8 412.19		
Within blood pressure	14	3 333.77		
Error	42	1 307.31	31.13	1.00
Total	59	12 753.27		

(2) 脳髄破壊白鼠による 2-2 用量検定：著者等は用量 0.342 γから 0.667 γ間で得た反応間に直線性を認め得たので，これら用量範囲で 2-2 用量検定を行つた．

標準品及び検体としていずれも国立衛生試験所エピレナミン標準品の同一濃度を含む溶液を用いた（すなわち実際の力価比は1）．米局XVのバソプレシン注射液の定量法に準拠し，標準品及び検体の各2用量で次に示す4対を作り，これを1組とした．

第1対： S_2，T_1　　第2対： S_1，T_2

第3対： T_2，S_1　　第4対： T_1，S_2

但しS_1及びS_2は標準品の低用量及び高用量としT_1及びT_2はそれぞれS_1及びS_2とほぼ等しい血圧上昇を示す検体の低用量及び高用量である．対内の注射順位は一定とし，対間の注射順位は無作為に選んだ．上記組合せにより，用量比 1.2，1.5 及び 2.0 の場合につき，それぞれ 1，2，3 組の注射で得た結果を検討し，次の結果を得た．

（A） 1組（注射回数8回）の注射による検定：Fig. 4 に用量比 1.5 で行つた血圧曲線例を示す．このような実験結果につき分散分析を行い，5％有意水準で標準品と検体で得た2直線間の平行性に有意な差を認めないものにつき力価比，信頼限界等を算出した．Table 3 に脳髄破壊白鼠 10 匹について種々用量比で得た検定結果をまとめて示す．全検定例中，5％有意水準で平行性の認められなかつた例は2例に過ぎない，すなわち 4.65％ で又 P=0.95 で信頼限界 80～125％の範囲外の例は 41 例中 6 例に過ぎず 14.63％ であつた．

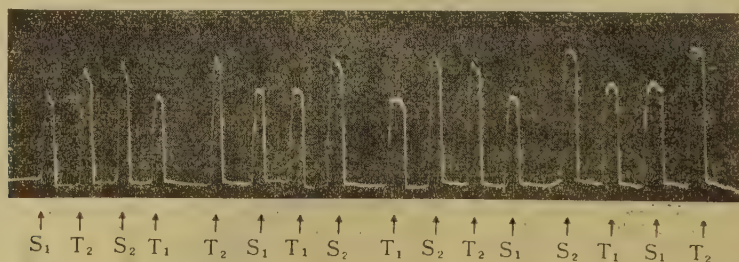



Fig. 4. Two and two dose assay (Dose ratio 1.5)

Table 3. Assay results obtained by injection of 4 pairs

Test animal No.	Dose ratio	Log potency ratio (M)	Potency ratio (R)***	Fiducial limits of error [P=0.95] (%)	Slope (b)	s	λ	s_M	W
126	2.0	0.0139	1.032	94.8～105.4	53.99	1.21	0.0224	0.0159	4 000
	2.0	0.0000	1.000	88.7～112.7	61.46	1.41	0.0230	0.0163	3 704
	2.0	0.0035	1.008	85.4～117.3	70.60	2.11	0.0299	0.0211	2 222
	2.0	−0.0030	0.993	87.1～114.8	83.89	2.19	0.0261	0.0185	2 941
	2.0	0.0116	1.027	93.3～107.2	86.38	1.15	0.0134	0.0095	11 111
128	2.0	0.0186	1.043	92.2～108.7	67.28	1.06	0.0158	0.0112	7 692
	2.0	0.0000	1.000	87.4～114.4	69.77	1.78	0.0255	0.0180	3 125
	2.0	−0.0035	0.992	92.1～110.1	72.26	1.21	0.0167	0.0118	7 143
	2.0	−0.0032	0.993	84.5～118.1	78.90	2.48	0.0314	0.0222	2 041
	2.0	0.0029	1.007	93.0～107.3	87.21	1.21	0.0139	0.0098	10 000
134	2.0	−0.0177	0.950	87.8～115.9	70.60	1.86	0.0263	0.0186	2 857
	2.0	0.0097	1.023	88.1～113.5	77.24	1.86	0.0241	0.0171	3 448
Mean		0.0045*	1.010*	99.0～101.0*	73.30 (10.00)**	1.63 (0.48)**	0.0224 (0.0061)**		
129	1.5	0.0043	1.010	89.5～112.0	58.21	1.21	0.0208	0.0147	4 545
	1.5	−0.0039	0.991	88.3～113.0	63.88	1.46	0.0228	0.0161	3 846
130	1.5	0.0267	1.064	87.4～117.7	46.85	1.57	0.0335	0.0240	1 724
	1.5	−0.0104	0.974	89.3～111.6	48.27	1.00	0.0207	0.0149	4 545
133	1.5	−0.0196	0.956	87.0～113.7	76.66	1.87	0.0244	0.0174	3 333
134	1.5	−0.0196	0.956	90.6～109.9	51.11	0.91	0.0179	0.0127	6 250
	1.5	−0.0335	0.926	88.9～111.3	59.63	1.22	0.0205	0.0148	4 545
	1.5	−0.0264	0.941	85.1～119.0	56.79	2.83	0.0296	0.0212	2 222
Mean		−0.0207*	0.9535	98.3～108.2	57.68 (9.65)**	1.51 (0.62)**	0.0238 (0.0053)**		
137	1.2	0.0011	1.002	95.3～105.1	88.38	0.82	0.0093	0.0066	25 000
	1.2	−0.0053	0.988	92.0～108.2	94.70	1.35	0.0143	0.0101	10 000
	1.2	−0.0050	0.989	91.4～108.8	101.10	1.53	0.0151	0.0107	9 091
	1.2	−0.0093	0.979	93.0～107.5	107.32	1.47	0.0138	0.0098	10 000
	1.2	0.0068	1.016	94.3～106.3	110.48	1.21	0.0109	0.0098	10 000
	1.2	0.0176	1.041	93.8～107.9	145.20	1.78	0.0123	0.0089	12 500
	1.2	−0.0068	0.985	92.6～107.5	110.48	1.46	0.0132	0.0094	11 111
138	1.2	−0.0064	0.985	93.3～109.0	116.79	1.77	0.0151	0.0107	9 091
	1.2	0.0000	1.000	88.3～113.0	126.26	2.52	0.0199	0.0141	5 000
140	1.2	−0.0038	0.991	82.1～120.1	66.29	1.57	0.0237	0.0168	3 571
	1.2	0.0103	1.024	85.7～122.0	72.60	1.79	0.0244	0.0176	3 226
	1.2	0.0288	1.069	88.9～122.3	69.44	1.53	0.0220	0.0176	3 226
147	1.2	0.0088	1.021	88.3～115.6	85.23	1.77	0.0208	0.0148	4 545
	1.2	−0.0023	0.995	94.6～105.3	110.48	1.06	0.0096	0.0068	20 000
	1.2	−0.0019	0.996	95.7～104.5	127.42	1.06	0.0083	0.0059	2 941
Mean		−0.0007*	0.9984*	99.2～100.9*	102.14 (7.21)**	1.51 (0.41)**	0.0155 (0.0047)**		
Total Mean		−0.0008*	0.9982*	99.4～100.6*					

* = Weighted mean.

** = Standard error. *** =Actual potency ratio 1.0.

（B） 2組（注射回数16回）の注射による検定：Fig. 5に用量比 1.2 で行つた血圧曲線例を示す．これにつき分散分析を行い，5％有意水準で標準品と検体で得た2直線間の平行性に有意な差を認めない．脳髄破壊白鼠 10 匹による種々用量比で得た検定結果につき力価比，信頼限界等を算出し Table 4 に示す．

Table 4. Assay results obtained by injection of 8 pairs

Test animal No.	Dose ratio	Log potency ra-tio (M)	Potency ratio (R)***	Fiducial limits of error [P=0.95] %	Slope b	s	λ	s_M	W
126	2.0	0.0000	1.0000	92.7~107.9	77.24	2.24	0.0290	0.0145	4 762
	2.0	0.0045	1.0100	94.9~105.4	82.66	1.69	0.0204	0.0102	9 615
128	2.0	0.0071	1.0160	93.5~107.1	69.77	1.50	0.0236	0.0118	7 194
	2.0	−0.0017	0.9961	92.8~107.8	74.34	2.19	0.0294	0.0147	4 630
	2.0	0.0000	1.0000	94.0~106.8	79.73	1.80	0.0226	0.0113	7 813
134	2.0	−0.0146	0.9672	91.2~109.4	76.83	2.67	0.0347	0.0174	3 300
Mean		* 0.0010	* 1.0020	92.9~107.7	76.76 ** (4.44)	2.02 ** (0.43)	0.0266 ** (0.0050)		
129	1.5	0.0014	1.0030	90.6~110.7	54.63	2.07	0.0038	0.0019	250 000
130	1.5	−0.0054	0.9877	89.8~111.4	46.85	1.67	0.0036	0.0018	333 333
133	1.5	−0.0192	0.9554	90.7~110.0	79.50	2.86	0.0359	0.0181	3 049
134	1.5	−0.0232	0.9479	94.3~107.8	53.95	1.18	0.0219	0.0110	8 264
Mean		−0.0029*	* 0.9933	99.2~100.7	58.73 ** (14.28)	1.95 ** (0.71)	0.0163 ** (0.0156)		
137	1.2	0.0026	1.0060	96.7~103.5	94.70	1.18	0.0125	0.0063	25 000
	1.2	0.0000	1.0000	94.4~105.9	123.11	2.60	0.0211	0.0106	8 929
	1.2	−0.0072	0.9835	96.8~103.2	104.17	1.25	0.0120	0.0060	27 778
	1.2	−0.0068	0.9845	96.0~104.0	110.48	1.67	0.0151	0.0070	17 241
	1.2	0.0068	1.0160	95.0~105.5	127.84	2.47	0.0193	0.0097	10 638
	1.2	−0.0061	0.9860	96.8~103.2	102.59	1.25	0.0122	0.0061	27 027
140	1.2	0.0129	0.9707	93.3~106.3	67.87	1.58	0.0233	0.0118	7 194
147	1.2	0.0023	1.0060	95.3~104.8	107.32	1.89	0.0176	0.0880	12 987
Mean		* −0.0030	* 0.9931	98.4~101.6	104.76 ** (18.50)	1.74 ** (0.31)	0.0166 ** (0.0044)		
Total Mean		* 0.0027	* 0.9938	99.3~100.6					

* =Weighted mean. ** = Standard error. *** = Actual potency ratio 1.0.

2組の実験21例中5%有意水準で標準品と検体で得た2直線間に平行性を認め得なかつた例は3例，すなわち14.2%であつたが，信頼限界80~125%外の例は1例もなく，その殆んど大部分は90~111%内の力価比を示した．

(C) 3組（注射回数24回）の注射による検定：Fig. 6に用量比2.0で行つた血圧曲線例を示す．このような実験結果につき分散分析を行い，5%有意水準で標準品と検体で得た2直線間の平行性に有意な差を認めないものにつき，力価比，信頼限界等を算出した．Table 5に脳髄破壊白鼠3匹について種々用量比で得た検定結果をまとめて示す．

3組の実験では5%有意水準で標準品と検体で得た2直線間の平行性に有意な差を認めた例は1例もなく，又力価比の信頼限界も全例90~111%内であつた．

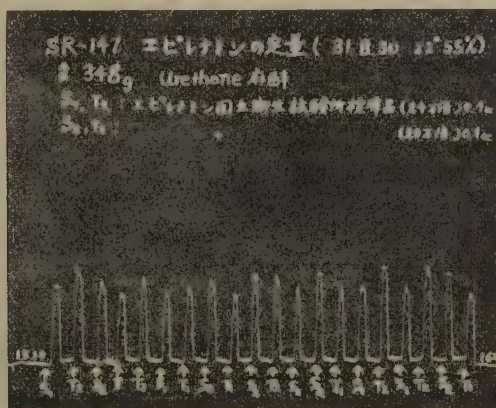



Fig. 5. Two and two dose assay (Dose ratio 1.2)

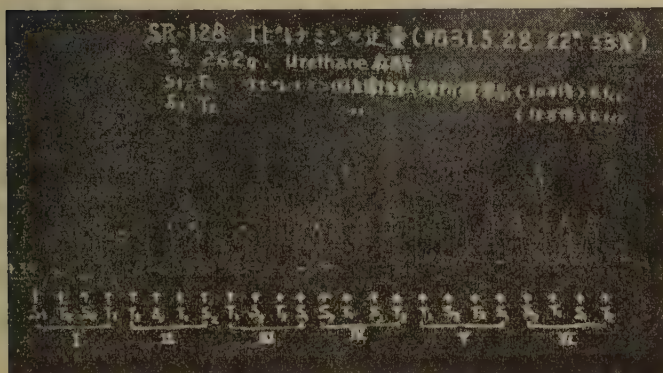



Fig. 6. Two and two dose assay (Dose ratio 2.0)

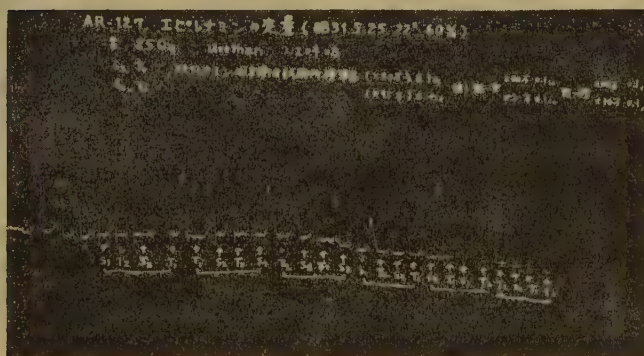



Fig. 7. Two and two dose assay using hexamethonium-treated rat (Dose ratio 2.0)

Table 5. Assay results obtained by injection of 12 pairs.

Test animal No.	Dose ratio	Log potency ratio (M)	Potency ratio (R)***	Fiducial limits of error [P=0.95](%)	Slope b	s	λ	sM	W
126	2.0	0.0062	1.014	93.7～103.4	66.23	2.28	0.0335	0.0137	5 319
	2.0	0.0000	1.000	93.6～106.9	71.98	2.38	0.0331	0.0135	5 495
	2.0	−0.0021	0.999	94.7～105.7	76.97	2.10	0.0286	0.0117	7 299
128	2.0	0.0054	1.013	94.4～105.9	75.58	2.16	0.0285	0.0116	7 407
Mean		0.0023*	1.006*	96.8～103.2	72.69 **(4.79)		0.0306 **(0.0032)		
137	1.2	0.0025	1.006	97.5～102.5	197.81	1.22	0.0061	0.0025	166 667
	1.2	−0.0064	0.986	96.4～103.7	210.44	1.29	0.0061	0.0025	166 667
	1.2	−0.0014	0.997	96.2～103.9	231.48	2.20	0.0095	0.0039	66 667
	1.2	0.0028	1.007	96.5～103.5	244.11	2.11	0.0087	0.0036	76 923
Mean		−0.0011*	0.997*	99.4～100.7	220.96 **(20.76)		0.0076 **(0.0018)		
Total mean		−0.0009*	0.9979*	99.3～100.8					

* Weighted mean. ** Standard error. *** Actual potency ratio 1.0.

(3) Hexamethonium Bromide処置白鼠による検定 : Hexamethonium Bromide 2mgを股静脈内に注射したが，血圧基線を全く一定にすることができなかつた．従つて得た結果も大きな誤差を含み，信頼限界80～125％内の実験は困難であつた．血圧曲線例をFig. 7に示す．このような実験結果につき分散分析を行い，5％有意水準で標準品と検体で得た2直線間の平行性に有意な差が認められないものにつき，力価比，信頼限界等を算出し，Table 6にまとめて示す．Table 6から4例の内2例が信頼限界80～125％内の力価比を示すに過ぎない．

Table 6. Assay results obtained by Hexamethonium Bromide- treated rat (8 pairs)

Test animal No.	Dose ratio	Log potency ratio (M)	Potency ratio (R)*	Fiducial limits of error [P=0.95](%)	b	s	λ
127	2.0	0.0295	1.070	83.0～122.0	76.41	5.43	0.071
127	2.0	0.0175	1.040	79.1～127.6	71.43	6.24	0.087
127	2.0	−0.0105	0.976	67.5～159.7	59.39	7.71	0.130
Mean……					69.08	6.50	0.029
131	1.5	−0.0028	0.994	92.7～108.0	90.86	8.25	0.029

* Actual Potency ratio 1.0

(4) 脳髄破壊白鼠法と他の方法との比較：Somersが報告している各種動物で得た値及び著者等の脳髄破壊白鼠及びHexamethonium Bromide処置白鼠で得た値をTable 7に示す．回帰線の傾斜については麻酔犬73と用量比2.0の時の脳髄破壊白鼠73とは，同一の値を示すが，用量比1.2の時脳髄破壊白鼠では105という大きな値を示している．λ値は脳髄破壊白鼠が一番小さく，従つて精度のよいことを示している．

Table 7. Comparison with other methods for bioassay of epinephrine

Method	Dose ratio	Experimentalist	b	s	λ	Number of assay
Anesthetized dog	2.0	Noel[10]	73	2.44	0.034	27
Hexamethonium dog	2.0	Somers[5]	44	1.77	0.041	2
Hexamethonium Cat	2.0	Somers[5]	53	2.09	0.042	19
Spinal Cat	2.0	Somers[5]	51	1.42	0.028	4
Spinal rat	2.0	Nagasawa, Nakayama and Serizawa	73	1.90	0.026	10
Spinal rat	1.2	Nagasawa, Nakayama and Serizawa	105	1.90	0.017	8
Hexamethonium rat	2.0	Nagasawa, Nakayama and Serizawa	69	6.53	0.096	3

むすび 以上の実験から，著者の脳髄破壊白鼠法は従来の犬，猫法よりすぐれた方法であることを知つた．

文献

1. Emmens, C. W. : Hormone assay, 92, 1950.
2. United States Pharmacopeia, XIV, 214.
3. 長沢佳熊，中山豪一．佐藤浩：本誌，70，13，1952.
4. 長沢佳熊，中山豪一，芹沢淳：本誌，72，1，1954.
5. Somers, G. F. : *Analyst*, 79, 627, 1954.
6. Landgrebe, F. W., M. H. Maccauley, H. Waring. : Proc. roy. Soc. Edinb., B62, 202, 1946.
7. Dekanski, J. : *Brit. J. Pharmacol.*, 7, 567, 1952.
8. United States Pharmacopeia, XV, 776, 1955.
9. 中山豪一：本誌，74，141，1956.
10. Noel, R. H. : *J. Pharmacol.*, 84, 278, 1945.

Summary

The dose-response relationship of epinephrine was examined by the use of pressor method of spinal rats and its two and two dose-assay was tried.

(1) There was no reason to doubt the hypothesis of linearity between log dose (0.342−0.667γ) and their response (see Table 1 and 2; Fig. 1, 2 and 3).

(2) This method of spinal rats is highly accurate micro assay for epinephrine, because of its higher susceptibility than that using cats and dogs.

(3) Even when the dose ratio is 1.2 and the number of injection is only 8 times, the fiducial limits of error ($P=0.95$) lies within 80−125%.

(4) This method is economically more advantageous, because of its simple procedure and its easy supply of rats, than cat or dog one.

Received June 18, 1957.

性腺刺戟ホルモンの研究（第3報）*

胎盤性性腺刺戟ホルモン日局標準品の製造及びその検定

長沢 佳熊，越村栄之助，岡崎 精一

Studies on Gonadotrophic Hormones III.
On the Preparation and the Assay of the Chorionic Gonadotrophin Standard of the Japanese Pharmacopoeia.

Kakuma NAGASAWA, Einosuke KOSHIMURA and Seiichi OKAZAKI

胎盤性性腺刺戟ホルモン日局標準品（1956）を妊婦尿から抽出，精製した後雑系白鼠を用いて検定を行つた成績についてここに報告する．

胎盤性性腺刺戟ホルモンの原料には通例妊娠初期の妊婦尿が用いられ，尿からの抽出法には（i）尿に水と混合する有機溶媒を加えてホルモンを沈澱させる沈澱法[2]（ii）吸着剤を加えてホルモンを吸着させる吸着法[3]などがある．粗製ホルモンは緩衡液，水性有機溶媒などで抽出し，有機溶媒を加えて沈澱させる方法をくり返して精製する．またクロマトグラフ法[4]で高純度のものが得られている．

胎盤性性腺刺戟ホルモンの検定法には（i）黄体及び出血点の形成による方法[5]（ii）子宮重量増加法（iii）卵巣重量増加法[6]（iv）その他の方法[7,8]があるが国薬[1]，英局[9]，国局[10]はいずれも幼若白鼠の卵巣重量増加法を用いている．英局[9]及び国局[10]では体重40～50gの幼若白鼠にホルモンの水溶液を1日1回，5日間皮下注射し，第6日に卵巣を摘出し，Bouin 液に1夜浸し，更に70% アルコールに2～4時間浸し脱水を行つた後取り出し，沪紙で附着する水分を除きトーションバランスで秤量し，卵巣重量増加による2-2検定法で計算を行う．検定に用いる用量はまず通例標準品 2，4，8，16 国際単位を用いて卵巣重量増加をしらべた後低用量はホルモンを注射しない対照動物の平均卵巣重量約10mgに対して15～20mg，高用量は30～35mgを示すような量とする． 1群白鼠10匹以上を用い表示量の90～110%〔その信頼限界は50～200%（P＝0.95)〕を含むものとする．その最小信頼限界は1群10匹を用いるとき，同腹仔の影響を考慮しないときは75～135%（P＝0.95)．考慮するときは86～116% P＝（0.95）であるという．国薬[1]では体重約45gの白鼠を用い，低用量は14～20mg高用量は22～35mgの卵巣重量増加を示すような2用量で1群白鼠10匹以上を用いて検定を行うとき表示量の90～110%〔(その信頼限界は50～200%（P＝0.95)〕を含むことに規定され，その後注射用胎盤性性腺刺戟ホルモンつにいては信頼限界は70～143%（P＝0.95）とされた．英局[9]と国薬[1]とで卵巣重量が異なるのは我が国の在来種の雑系白鼠は一般に卵巣重量が小さいことによる．

著者等は Gurin 等[3]の安息香酸吸着法で得た粗製品を水性アルコールで抽出し，アルコールで沈澱させ精製し製品とした．本品を去勢幼若白鼠の子宮重量増加法[12]で卵胞ホルモンを検定するとき，卵胞ホルモンはほとんど含まれない（実験1参照)．検定に適当な用量を定めるため国際標準品の1，2，4，8，16，32単位を用い，用量反応直線を求めた結果，4～32国際単位また製品ではその25～200γがほぼ同様な直線を示したので中間値の8及び16国際単位をそれぞれ低用量，高用量に定めた（実験2参照)．製品の力価を検定した結果（実験3参照）から1mg＝10国際単位になるように計算量の乳糖でうすめデシケータ（五酸化燐）中で恒量になるまで減圧乾燥した．本品について3回の検定結果を平均し，1mg＝10.8単位とした．この単位は国際単位と等しくしたのであるが計算値とも大体一致し，その信頼限界は3例中最低が74～137%（P＝0.95)．最高が85～118%（P＝0.95）である．重みを加えた平均値[13]から力価を求めると1mg＝11.0単位である．(実験5参照)．これをガラス管中に1管当り約1000単位相当量を秤取し，再びデシケータ（五酸化燐）中で減圧乾燥しガラス管を融閉し製品とした（実験4，5参照)．

---

* 第2報は長沢佳熊，越村栄之助，岡崎精一：衛生試験所報告，73，25（1955)．

実験の部

実験 1 妊婦尿から胎盤性性腺刺戟ホルモンの抽出及び精製　妊娠約3カ月の妊婦尿を朝集めてそのまま実験室へ持参し排泄後約3時間後に安息香酸吸着法で処理し得た粗製品を更に精製する．(Table 1参照).

Table 1.

Pregnant Urine (2*l*)
　| Adjust pH to 3.5 with acetic acid, filter
Filtrate
　| Add 200 cc of benzoic acid saturated acetone with agitation, and filter after one night satnding in a ice chamber
Precipitate
　| Wash with benzoic acid saturated ice water
Precipitate
　| Wash with acetone, and centrifuge
Precipitate
　| Dry under vacuum
Dried Powder
　| Extract with 5 cc of 50 % alcohol, three times
Supernatant
　| Add 4 vol. of absolute alcohol, and centrifuge after one night standing in a ice chamber
Precipitate
　| Wash with acetone and ether, dry under vacuum
Dried Powder (0.8g)

本品中における卵胞ホルモンの夾雑如何を調べるため，本品の水溶液を1日2回，3日間幼若去勢白鼠に皮下注射し，4日目に子宮重量を秤つた (Table 2参照).

Test of the follicular hormone in the material

Table 2.

Sample Dried Powder (γ)		Uterine Weight * (mg)
600	85.8iu**	18.5
600	85.8iu	22.0
600	85.8iu	20.6
0	(Control)	25.0
0	(Control)	20.0
0	(Control)	17.0

* Uterine weight of ovarectomized immature rats four days after injection of the chorionic gonadotrophins tandard.
** International unit

水だけを注射した対照との間に差を認めず，本品600γ (85.8iu) では卵胞ホルモン作用を認めない．

実験 2 胎盤性性腺刺戟ホルモンによる幼若白鼠の卵巣重量増加の用量反応線　国際標準品1，2，4，8，16，32 国際単位を幼若白鼠に与えたときの卵巣重量増加は Table 3 のとおりである．

Table 3.

Dose	International Chorionic Gonadotrophin Standard 32 iu*	16 iu*	8 iu*	4 iu*	2 iu*	1 iu*
Ovarian Weight (mg)	42.8	44.5	29.5	19.5	20.0	11.4
	44.5	43.2	31.6	22.8	16.0	18.5
	62.7	37.8	27.2	22.8	20.0	17.8
	60.0	44.5	31.9	16.2	16.5	10.8
	42.0	52.0	32.0	27.5	18.2	19.5
	43.5	35.0	34.0	20.8	19.5	9.4
	47.0	43.0	34.0	29.5	18.5	11.5
	39.5	30.0	—	17.5	19.5	14.4
	50.5	33.2	—	20.2	19.5	15.2
	—	44.2	—	22.0	—	10.2
Total	432.5	407.4	220.2	218.6	167.7	138.7
Numbers of Animals	9	10	7	10	9	10
Mean	48.06	40.74	31.46	21.86	18.63	13.87

* iu……international unit

Table 3から4，8，16，32国際単位の4用量について分散分析を行うと Table 4 のとおりである．

Table 4.

Adjustment for Mean……45418.7

Nature of Variation	Degree of Freedom	Sum of Squear	Mean Squear	
Regression	1	3658.9534		
Deviation from Regression	2	9.4204	4.7102	$F=0.138<F^{2}_{32}=3.30$ (P=0.95)
Between Doses	3	3668.3738		
Within Doses	32	1090.50	34.08	
Total	35	4758.84		

従つて直線性は成立する．回帰方程式（Y）を求めると Table 5 のとおりである．

Table 5.

	log Dose (x)	Mean of Ovarian Weight (y)	Numbers of Animals (n)	nx	ny	nx²	nxy	ny²
	0.6021	21.86	10	6.021	218.6	3.6252	131.6191	4778.5960
	0.9031	31.46	7	6.322	220.2	5.7092	198.8805	6928.1212
	1.2041	40.74	10	12.041	407.4	14.4990	490.5503	16597.4760
	1.5051	48.06	9	13.546	432.5	20.3877	651.0159	20787.8724
Total	4.2144	142.12	36	37.930	1278.7	44.2211	1472.0658	49092.0656
Mean	1.0536($\bar{x}$)	35.53($\bar{y}$)				39.9635	1347.2525	45418.7136
						4.2576	124.8133	3673.3520

$b=124.8133/4.2576=29.3154$

$Y=\bar{y}+b(x-\bar{x})=4.644+29.315x$

胎盤性性腺刺戟ホルモン日局標準品原料25, 50, 100, 200γ による卵巣重量増加は Table 6 のとおりである．

Table 6.

Dose	Chorionic Gonadotrophin Material for Japanese Pharmacopoeia Standard 200 γ	100 γ	50 γ	25 γ
Ovarian Weight (mg)	53.1	32.5	33.0	27.5
	70.0	34.0	27.0	19.2
	47.4	40.0	37.0	20.0
	43.0	27.0	29.0	21.5
	59.0	38.5	32.1	23.5
	60.0	45.0	21.5	20.5
	49.0	49.0	31.0	16.2
	43.0	43.1	24.3	22.2
	47.2	47.5	20.9	20.0
	48.0	33.0	38.8	—
Total	519.7	389.6	294.6	190.6
Numbers of Animals	10	10	10	9
Mean	51.97	38.96	29.46	21.18

Table 6 について分散分析を行うと Table 7 のとおりである．

Table 7.

Adjustment for Mean……49862.3

Nature of Variation	Degree of Freedom	Sum of Squear	Mean Squear	
Regression	1	4985.3850		
Deviation from Regression	2	55.3404	27.6702	$F=0.622<F^{2}_{35}=3.28$ (P=0.95)
Between Doses	3	5040.7254		
Within Doses	35	1556.86	44.48	
Total	38	6597.59		

従つて直線性は成立する．回帰方程式（Y）を求めると Table 8 のとおりである．

Table 8.

	log Dose (x)	Mean of Ovarian Weight (y)	Numbers of Animals (n)	nx	ny	nx²	nxy	ny²
	1.3979	21.18	9	12.581	190.6	17.5869	266.4675	4037.3316
	1.6990	29.46	10	16.990	294.6	28.8660	500.5254	8678.9160
	2.0000	38.96	10	20.000	389.6	40.0000	779.2000	15178.8160
	2.3012	51.97	10	23.010	519.7	52.9460	1195.8297	27008.8090
Total	7.3979	141.57	39	72.581	1394.5	139.3989	2742.0226	54903.8726
Mean	1.8495($\bar{x}$)	35.39($\bar{y}$)				135.0770	2595.2359	49862.3154
						4.3219	146.7867	5041.5572

$b=146.7867/4.3219=33.9635$

$Y=\bar{y}+b(x-\bar{x})=34.964x-29.276$

Table 3 および Table 6 をグラフで表わすとFig. 1 となる．

Fig. 1 Dose Response Line of Chorionic Gonadotrophin

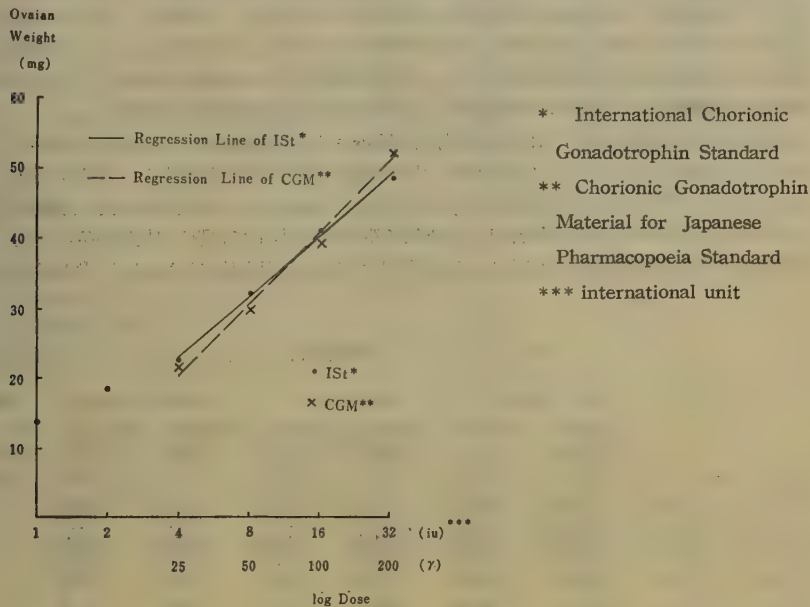
* International Chorionic Gonadotrophin Standard
** Chorionic Gonadotrophin Material for Japanese Pharmacopoeia Standard
*** international unit

実験 3　日局標準品原料の検定　国際標準品 8，16 国際単位及び日局標準品原料 64，128 γ を用いて検定した結果は Table 9 のとおりである．

Table 9.

	ISt* 16 iu**		ISt* 8 iu**		CGM*** 128γ		CGM*** 64γ	
	Ovarfan Weight (mg)	Deviation from Mean	Ovarian Weight (mg)	Deviation from Mean	Ovarian Weight (mg)	Deviation from Mean	Ovarian Weight (mg)	Deviation from Mean
	29.5	−11.83	32.0	3.60	40.5	−3.27	28.5	−2.50
	47.5	6.17	26.0	−1.80	40.5	−3.27	24.5	−6.50
	44.5	3.17	28.5	0.10	43.0	−0.77	31.0	0.00
	43.0	1.67	32.5	4.10	44.5	0.73	27.5	−3.50
	34.0	−7.33	21.0	−7.40	37.0	−6.77	36.5	5.50
	42.0	0.67	27.0	−1.40	46.0	2.23	27.7	−3.30
	42.0	0.67	25.0	−3.40	50.0	6.23	37.5	6.50
	43.5	2.17	31.0	2.60	49.0	5.23	32.3	1.30
	44.5	3.17	43.0	4.60	40.5	−3.27	28.5	−3.00
	42.0	0.67	15.0	−12.50	45.5	1.73	30.0	−0.50
	56.5	15.17	35.0	6.60	50.0	6.23	33.0	2.00
	46.5	5.17	38.0	9.60	54.5	10.73	38.0	7.00
	46.4	5.07	17.5	−10.90	33.5	−10.27	19.0	−12.00
	23.5	−17.83	25.0	−3.40	39.0	−4.77	37.0	6.00
	34.6	−6.83	—	—	43.0	−0.77	34.0	3.00
Total	619.9	—	397.6	—	656.5	—	465.0	—
Numbers of Animals	15	—	14	—	15	—	15	—
Mean	41.33 (S2)	—	28.40 (S1)	—	43.77 (T2)	—	31.00 (T1)	—

* ISt……International Chorionic Gonadotrophin Standard　　** iu ……international unit

*** CGM…Chorionic Gonadotrophin Material for Japanese Pharmacopoeia Standard

Table 9から計算すると次のとおりである.

$I=\log 2=0.3010$, $E=(T2-T1+S2-S1)/2=12.85$, $F=(T1+T2-S1-S2)/2=2.52$, $b=E/I=42.69$, $M=F/b=0.0590$, $R=\text{Antilog } M=1.146$, $S^2=\sum d^2/\sum(n-1)=45.36$, $V=S^2/n=3.06$, $t=(T1+S2-T2-S1)/2\sqrt{V}=0.004<t=2.005$ (P=0.95with 55 degrees of freedom), $A=V=3.06$, $B=V/I^2=33.77$, $g=Bt^2/b^2=0.0745<0.1$, $\log F.L.E.=2\pm(t\sqrt{A+BM^2})/b=1.9160\sim2.0840$, F.L.E. =82.5〜121.3%; CGM64γ= 8国際単位×1.146=9.168国際単位, CGM100γ=14.3国際単位と想定される.

実験 4 日局標準品の調製　日局標準品原料745mg=106721国際単位をとり乳糖8.9344gと少量ずつ軽くかき混ぜ充分に混合し，デシケータ（五酸化燐）中で恒量になるまで減圧乾燥する．本品の力価は 106721国際単位/(8.9344g+0.7450g)，10mg=110.26国際単位と想定される．恒量になるまで乾燥した後，力価検定を行い，ガラス管中に1管当り約1000単位相当量を秤取し前と同条件で減圧乾燥して融閉し日局標準品とする.

実験 5 日局標準品の検定　前述のように調製した日局標準品を検定した結果を Table10〜12に示す.

Table 10.

	ISt* 16 iu**		ISt* 8 iu**		NSt*** 1.6mg		NSt*** 0.8mg	
	Ovarian Weight (mg)	Deviation from Mean	Ovarian Weight (mg)	Deviation from Mean	Ovarian Weight (mg)	Deviation from Mean	Ovarian Weight (mg)	Deviation from Mean
	36.6	2.50	25.2	1.67	27.4	−5.48	26.3	−0.72
	34.8	0.70	26.4	2.87	25.6	−7.28	28.6	1.58
	36.0	1.90	21.2	−2.33	37.4	−5.48	23.7	5.68
	32.6	−1.50	33.0	9.47	32.6	−0.28	21.5	−5.52
	45.0	10.90	20.4	−3.13	46.2	13.32	20.0	−7.02
	31.5	−2.60	25.9	2.37	26.5	−6.38	33.5	6.48
	34.5	0.40	18.6	−4.93	37.6	4.72	23.0	−4.02
	30.0	−4.10	24.0	0.47	39.5	6.62	28.6	1.58
	41.0	6.90	19.8	−3.37	31.7	−1.18	25.6	−1.42
	26.0	−8.10	32.4	8.87	34.4	1.52	27.1	0.08
	44.5	10.40	16.6	−5.93	30.6	−2.28	27.1	0.08
	26.3	−7.80	16.6	−5.93	36.4	3.52	30.2	3.18
	30.0	−4.10	25.3	1.77	31.6	−1.28	—	—
	28.4	−5.70	24.0	0.47	—	—	—	—
	—	—	23.5	−0.03	—	—	—	—
Total	477.4	—	352.9	—	427.5	—	324.2	—
Numbers of Animals	14	—	15	—	13	—	12	—
Mean	34.10	—	23.53	—	32.88	—	27.02	—

* ISt……International Chorionic Gonadotrophin Standard

** iu ……international unit

*** NSt …Chorionic Gonadotrophin Standard of Japanese Pharmacopoeia

Table 11.

	ISt* 16 iu**		ISt* 8 iu**		NSt*** 1.6mg		NSt*** 0.8mg	
	Ovarian Weight (mg)	Deviation from Mean	Ovarian Weight (mg)	Deviation from Mean	Ovarian Weight (mg)	Deviation from Mean	Ovarian Weight (mg)	Deviation from Mean
	32.4	−1.10	22.4	−3.50	32.0	−3.30	20.4	−4.46
	23.8	−9.70	36.5	10.60	27.2	−8.10	17.0	−7.86
	27.0	−6.50	26.0	0.10	43.5	8.20	20.0	−4.86
	36.0	2.50	22.5	−3.40	32.8	−2.50	38.5	13.64
	34.6	1.10	25.5	0.40	37.8	2.50	23.8	−1.06

	27.4	−6.10	23.6	−2.30	40.6	5.30	26.8	1.94
	35.0	1.50	28.2	2.30	40.6	5.30	25.4	0.54
	35.0	1.50	28.2	2.30	35.8	0.50	23.5	−1.36
	51.0	17.50	14.6	−11.30	43.0	7.70	25.4	0.54
	20.6	−13.00	21.4	−4.50	32.7	−2.60	26.7	1.84
	31.5	2.00	19.0	−6.90	34.2	−1.10	24.0	−0.86
	39.2	5.70	41.4	15.50	25.5	−9.80	27.1	2.24
	47.2	13.70	28.0	2.10	23.5	−1.80	24.6	−0.26
	28.4	−5.10	25.3	−0.60	35.0	−0.30	—	—
Total	469.0	—	362.6	—	494.9	—	323.2	—
Numbers of Animals	14	—	14	—	14	—	13	—
Mean	33.50	—	25.90	—	35.30	—	24.86	—

* ISt……International Chorionic Gonadotrophin Standard

** iu ……international unit

*** NSt …Chorionic Gonadotrophin Standard of Japanese Pharmacopoeia

Table 12.

	ISt* 16 iu**		ISt* 8 iu**		NSt*** 1.6mg		NSt*** 0.8mg	
	Ovarian Weight (mg)	Deviation from Mean	Ovarian Weight (mg)	Deviation from Mean	Ovarian Weight (mg)	Deviation from Mean	Ovarian Weight (mg)	Deviation from Mean
	34.4	−8.61	35.0	9.81	62.5	13.50	32.5	5.30
	49.0	5.99	22.7	−2.49	58.8	9.80	22.0	−5.20
	45.8	2.79	17.1	−8.09	51.0	2.00	24.2	−3.00
	56.8	13.79	28.3	3.11	49.0	0.00	31.0	3.80
	42.7	−0.31	14.0	−9.19	43.5	−5.50	22.0	−5.20
	54.5	11.49	38.5	13.31	49.5	0.50	24.4	−2.80
	42.7	−0.31	25.2	0.01	44.5	−4.50	19.5	−7.70
	50.2	7.19	29.2	4.01	34.5	−14.50	19.5	−7.70
	31.3	−11.71	20.9	−4.29	42.5	−6.50	24.7	−2.50
	49.0	5.99	21.0	−4.19	49.2	0.20	33.6	6.40
	37.0	−6.01	—	—	46.0	−3.00	42.8	15.60
	41.6	−1.41	—	—	41.0	−8.00	38.0	10.80
	37.8	−5.21	—	—	39.0	−10.00	19.4	−7.80
	29.4	−13.61	—	—	—	—	—	—
Total	602.2	—	251.9	—	611.0	—	353.6	—
Numbers of Animals	14	—	10	—	13	—	13	—
Mean	43.01	—	25.19	—	49.00	—	27.20	—

* ISt……International Chorionic Gonadotrophin Standard

** iu ……international unit

*** NSt …Chorionic Gonadotrophin Standard of Japanese Pharmacopoeia

Table10～12 から 2 - 2 用量検定法で計算を行うと Table 13 の通りである．

3 回の測定値を平均すると R＝1.0807，日局標準品 1 mg＝10.8 単位(＝国際単位)となる．又重みを加えた平均値（$\bar{R}$）を求めると Table14 のとおりである．

Table 13

	Table 10	Table 11	Table 12
I	0.3010	0.3010	0.3010
E	8.68	8.75	18.81
F	1.14	0.38	3.00
b	28.84	29.07	62.49
M	0.0395	0.0127	0.0480
R	1.095	1.030	1.117
S^2	28.59	43.18	62.04
V	2.12	3.13	4.96
t	1.621	−0.802	0.444
A＝V	2.12	3.13	4.96
B	23.40	34.55	54.75
g	0.1137	0.1653	0.0569
log F.L.E.	1.8963～2.1139	1.8683～2.1367	1.9271～2.0729
F.L.E.%	78.8～130.0	73.8～137.0	84.5～118.3

Table 14.

	M	$w=4t^2/L^2$*	wM
Table 10	0.0395	341.99	13.5086
Table 11	0.0127	224.67	2.8533
Table 12	0.0480	762.44	36.5971
Total		1329.10	52.9590

$\bar{M}=\sum(wM)/\sum w=0.0398$

$\bar{R}=\mathrm{antilog}\bar{M}=1.096$

* L……$\{t\sqrt{A(1-g)+BM^2}/b(1-g)\}\times 2$

日局標準品 1 mg＝11.0 単位＝国際単位となる．

むすび

妊婦尿から安息香酸吸着法で得た粗製胎盤性性腺刺戟ホルモンを精製し，尿 2 l から 1 mg143 国際単位の製品 0.8g（6 2000国際単位）を得た．本品を乳糖で薄め更にデシケータ（五酸化燐）中で減圧乾燥し日局標準品とした．日局標準品の力価は幼若雌系白鼠の卵巣重量増加法により国際標準品を用いて 3 回検定を行い，平均して 1 mg＝10.8 単位（＝国際単位）と定めた．又重みを加えた平均値からは 1 mg＝11.0 単位（＝国際単位）である．

文　　献

1) 第二改正国民医薬品集，232 (1955).
2) British Pharmacopoea, VII, 250 (1953).
3) Gurin, S., Bachmann, C. and Wilson, D. W. : J. Biol. Chem., 128, 525 (1939).
4) Katzman, P. A., Godfrid, M., Cain, C. K. and Doisy, E. A. : ibid., 148, 501 (1943).
5) Ashheim, S. and Zondek, B. : *Klin. Wochnsh.*, 7, 1404 (1928).
6) Dolfman, R. I. and Rubin, B. L. : *Endoc.*, 41, 456 (1947).
7) Friedman, H. M. and Lapham, M. E. : *Am. J. Obst. Gynec.*, 21, 405 (1931).
8) Mainini, C. G. : J. Am. Med. Assoc., 138, 121 (1948).
9) British Pharmacopoea, VIII, 814 (1953).
10) Pharmacopoea Internationalis, Editio Prima, Volumen I, 261 (1955).
11) 第二改正国民医薬品集，追補2，6 (1956).
12) 長沢佳熊，越村栄之助，岡崎精一：衛生試験所報告，73，17 (1955).
13) Pharmacopoeia of U.S.A., XV, 879 (1956).

Summary

0.8 g of chorionic gonadotrophin (143 international unit per mg) was prepaerd from 2 1 pregnant urine by benzoic acid adsorption method. The product was mixed with lactose, dried under vacuum over phosphorus pentoxide and adopted as the chorionic gonadotrophin standard of the japanese Pharmacopoeia. The potency of the standard was found 10.8 unit, the weighted mean of which was 11.0 unit per mg, by the British Pharmacopoeia rat assay method using the International Standard of Chorionic Gonadotrophin.

Received June 18, 1957

性腺刺戟ホルモンの研究（第4報）*血清性性腺刺戟ホルモン日局標準品の製造及びその検定

長沢佳熊，越村栄之助，岡崎精一

Studies on Gonadotrophic Hormones IV. On the Preparation and the Assay of the Serum Gonadotrophin Standard of the Japanese Pharmacopoeia.

By Kakuma NAGASAWA, Einosuke KOSHIMURA and Seiichi OKAZAKI.

血清性性腺刺戟ホルモンの検定法については国薬[1]，国局[2]，英局[3]，などに記載されている．著者等は第2報[4]で雑系白鼠を用いて充分検定できることを報告したが，今回は日局標準品（1956）の製造及び検定を行つた結果について更に報告する．

英局[3]及び国局[2]では体重40～50gの幼若白鼠にホルモンの水溶液を1回皮下注射し，第6日に卵巣を摘出してBouin液に1夜浸し，70％アルコールに2～4時間浸し脱水を行つた後取出しトーションバランスで秤量し卵巣重量増加による2-2用量検定法で計算を行う．検定に用いる用量は，まず通例標準品10，20，40，80単位を用いて卵巣重量の増加を調べた後低用量はホルモンを注射しない対照動物の平均卵巣重量約10mgに対して40～50mg，高用量は80～100mgを示すような量とする．1群白鼠10匹以上を用い表示量の90～111％〔その信頼限界は65～155％（p＝0.95)〕を含むものとする．その最少信頼限界は1群10匹を用いるとき，同腹仔の影響を考慮しないときは86～116％（p＝0.95)，考慮するときは93～107％（p＝0.95）であるという．国薬[1]では体重約45gの白鼠を用い，低用量は30～40mg，高用量は60～80mgの卵巣重量を示すような2用量で1群白鼠10匹以上を用い表示量の90～110％〔その信頼限界は65～155％（p＝0.95)〕を含むことに規定され，その後注射用血清性性腺刺戟ホルモン[5]については信頼限界は70～143％（p＝0.95）とされた．英局[3]と国薬[1]とで卵巣重量が異なるのは我が国の在来種の雑系白鼠は一般に卵巣重量が小さいことによる．

著者等は1mg 2500国際単位の製品（デンマーク Organon 社製）を稀アルコールに溶かし計算量の乳糖と混和し，デシケータ(五酸化燐）中で恒量になるまで減圧乾燥して日局標準品を製した（実験1参照）国際標準品を用いて本品の力価を検定するとき国薬[1]の示す程度の卵巣重量増加を示すような2用量を用いると用量比がかなり大きくなるので第2報[4]及び胎盤性性腺刺戟ホルモンの検定[6]のときと同様に用量比＝2にして検定を行つた（実験2 3参照)．3回の検定結果を平均し1mg＝1.8単位とした．この単位は国際単位と等しくしたのであるが予想単位よりはるかに低かつた．その信頼限界は3例中最低が70～136％，最高が81～124％．胎盤性性腺刺戟ホルモンの検定成績[6]に劣る．重みを加えた平均値[7]から力価を求めると1mg＝1.8単位である（実験3参照)．この製品をガラス管中に1管当り約1000単位相当量を秤取し，再びデシケータ（五酸化燐）中で減圧乾燥しガラス管を融閉し製品とした（実験1参照)．

実験の部

実験1 日局標準品の調製　血清性性腺刺戟ホルモン19mg＝47500国際単位（Organon社製，1mg＝2500国際単位）をとり，60％アルコール2ccに溶かし乳糖11.8560gに加えてよくかき混ぜ，容器は更に60％アルコール0.5ccで2回洗い，洗液は乳糖に加え，デシケータ（五酸化燐）中で恒量になるまで減圧乾燥後更によくかき混ぜる．本品の力価は47500国際単位/(1.8560g＋0.0190g)，10mg＝40国際単位と想定される．恒量になるまで乾燥した後，力価検定を行い，ガラス管中に1管当り約1000単位相当量を秤取し前と同条件で減圧乾燥して融閉し日局標準品とする．

---

* 第3報は長沢佳熊，越村栄之助，岡崎精一：衛生試験所報告，75，135（1957）

実　験 2　日局標準品の検定（予試験）体重約45gの白鼠を用い国際標準品を用いて検定を行つた結果をTable1に示す．

Table 1.

	ISt* 20iu**		ISt* 10iu**		NSt***6.4mg		NSt*** 3.2mg	
	Ovarian Weight (mg)	Deviation from Mean	Ovarian Weight (mg)	Deviation from Mean	Ovarian Weight (mg)	Deviation from Mean	Ovarian Weight (mg)	Deviation from Mean
	70.5	23.77	33.2	0.99	30.3	−8.11	14.0	−9.06
	29.6	−17.13	24.1	−8.11	42.8	4.39	19.5	−3.56
	44.3	−2.43	47.0	14.79	25.8	−12.61	20.5	−2.56
	27.5	−19.23	51.2	18.99	28.2	−10.21	25.2	2.14
	74.6	27.87	29.3	−2.91	78.6	40.19	23.0	−0.06
	56.8	10.07	39.5	7.29	38.0	−0.41	26.0	2.94
	34.0	−12.73	19.3	−12.91	38.0	−0.41	24.6	1.54
	24.5	−22.23	34.4	2.19	37.2	−1.21	22.0	−1.06
	45.2	−1.53	26.5	−5.71	17.6	−20.81	37.5	14.44
	40.3	−6.43	42.8	10.59	31.0	−7.41	21.8	−1.26
	50.5	3.77	20.5	−11.71	39.8	1.39	18.5	−4.56
	44.4	−2.33	39.5	7.29	53.8	15.39	17.4	−5.66
	31.6	−15.13	27.6	−4.61	35.1	−3.31	27.5	4.44
	81.5	34.77	19.5	−12.71	40.8	2.39	24.8	1.74
	48.6	1.87	32.0	−0.21	39.1	0.69	23.6	0.54
Total	700.9		483.2		576.1		345.9	
Numbers of Animals	15(n)		15(n)		15(n)		15(n)	
Mean	46.73 (S2)		32.21 (S1)		38.41 (T2)		23.06 (T1)	

*　ISt………International Serum Gonadotrophin Standard

**　iu………international unit

***　NSt………Serum Gonadotrophin Standard of Japanese Pharmacopoeia

Table 1. から計算を行うと次のとおりである．

$I=\log 2=0.3010$, $E=(T2-T1+S2-S1)/2=14.94$, $F=(T1+T2-S1-S2)/2=-8.74$, $b=E/I=49.63$ $M=F/b=-0.1761$, $R=\text{Antilog}M=0.667$, $S^2=\sum d^2/\sum(n-1)=165.54$, $V=S^2/n=11.04$, $t=(T1+S2-T2-S1)/2\sqrt{V}=-0.127<t=2.004$ (P =0.95 with 56 degnees of fneedom), $A=V=11.04$, $B=V/I^2=121.85$, $g=Bt^2/b^2=0.1987$, $\log F.L.E.=2+gM/(1-g)\pm t\sqrt{A(1-g)+BM^2}/b(1-g)$ $=1.7773\sim 2.1353$, F.L.E. = 59.9～136.6％ ; NS t3.2mg = 10国際単位×0.667 = 6.67国際単位，NSt 1 mg≒2.1国際単位と想定される．

実　験 3　日局標準品の検定（本試験）前述の想定単位にもとずき検定を行つた結果をTable 2～4に示す．

Table 2.

	ISt* 20iu**		ISt* 10iu**		NSt*** 10mg		NSt*** 5mg	
	Ovarian Weight (mg)	Deviation from Mean	Ovarian Weight (mg)	Deviation from Mean	Ovarian Weight (mg)	Deviation from Mean	Ovarian Weight (mg)	Deviation from Mean
	32.2	−11.13	33.6	2.61	32.0	−9.13	19.7	−10.67
	38.0	−5.33	26.2	−4.79	32.3	−8.83	30.6	0.23
	35.2	−8.13	26.8	−4.19	23.0	−18.13	33.0	2.63
	27.8	−15.53	34.5	3.51	39.6	−1.53	25.3	−5.07
	59.0	15.67	36.5	5.51	30.8	−10.33	35.0	4.63
	47.1	3.77	23.4	−7.59	43.1	1.97	31.1	0.73
	38.1	−5.23	36.8	5.81	57.6	16.47	29.8	−0.57
	53.0	9.67	26.4	−4.59	40.3	−0.83	42.2	11.83
	48.9	5.57	34.0	3.01	24.5	−16.63	33.0	2.63
	55.0	11.67	34.3	3.31	51.4	10.27	27.4	−2.97
	39.5	−3.83	34.3	3.31	64.2	23.07	20.0	−10.37
	42.6	−0.73	26.1	−4.89	41.0	−0.13	37.6	7.23
	54.0	10.67	30.0	−0.99	54.1	13.97	30.1	−0.27
	37.5	−5.83	—	—	39.6	−1.53	—	—
	42.0	−1.33	—	—	43.5	2.37	—	—
Total	649.9		402.9		617.0		394.8	
Numbers of Animals	15		13		15		13	
Mean	43.33		30.99		41.13		30.37	

* ISt………International Serum Gonadotrophin Standard

** iu………international unit

*** NSt………Serum Gonadotrophin Standard of Japanese Pharmacopoeia

Table 3.

	ISt* 20iu**		ISt* 10iu**		NSt*** 10mg		NSt*** 5mg	
	Ovarian Weight (mg)	Deviation from Mean	Ovarian Weight (mg)	Deviation from Mean	Ovarian Weight (mg)	Deviation from Mean	Ovarian Weight (mg)	Deviation from Mean
	40.8	−10.88	25.1	−7.59	57.0	10.43	22.4	−9.41
	61.0	9.32	40.0	7.31	43.4	−3.17	25.4	−6.41
	45.0	−6.68	52.1	19.41	29.8	−16.77	26.9	−4.91
	53.2	1.52	29.0	−3.69	38.0	−8.57	31.4	−0.41
	42.0	−9.68	26.0	−6.69	50.0	3.43	32.8	0.99
	45.0	−6.68	25.1	−7.59	51.5	4.93	17.8	−14.01
	63.6	11.92	32.0	−0.69	62.0	15.43	23.0	−8.81
	53.2	1.52	25.5	−7.19	94.0	47.43	22.1	−9.71
	36.3	−15.38	51.7	19.01	32.5	−14.07	53.5	21.69
	72.8	21.12	27.1	−5.59	38.6	−7.97	34.3	2.49
	29.4	−22.28	23.0	−9.69	41.0	−5.57	33.4	1.59
	89.7	38.02	36.0	3.31	52.0	5.43	46.0	14.19
	39.8	−11.88	30.1	−2.59	32.0	−14.57	34.1	2.29
	—	—	35.0	2.31	45.6	−0.97	42.3	11.49
	—	—	—	—	31.2	−15.37	—	—
Total	671.8		457.7		698.6		445.4	
Numbers of Animals	13		14		15		14	
Mean	51.68		32.69		46.57		31.81	

* ISt………International Serum Gonadotrophin Standard

** iu………international unit

*** NSt………Serum Gonadotrophin Standard of Japanese Pharmacopoeia

Table 4.

	ISt* 20iu**		ISt* 10iu**		NSt*** 10mg		NSt*** 5 mg	
	Ovarian Weight (mg)	Deviation from Mean	Ovarian Weight (mg)	Deviation from Mean	Ovarian Weight (mg)	Deviation from Mean	Ovarian Weight (mg)	Deviation from Mean
	40.0	−1.77	12.6	−7.92	26.6	−10.17	26.8	7.89
	43.5	1.73	16.5	−4.02	44.8	8.03	14.0	−4.91
	88.2	46.43	14.8	−5.72	36.5	−0.27	34.0	15.09
	44.5	3.73	10.6	−9.92	47.4	10.63	14.4	−4.81
	19.9	−21.87	24.3	3.78	40.4	3.63	16.0	−2.91
	34.6	−7.17	25.5	4.98	40.7	3.23	13.8	−5.11
	18.3	−23.47	21.4	0.88	15.3	−11.47	18.7	−0.21
	61.5	19.73	21.2	0.68	35.3	−1.47	17.1	−1.81
	23.5	−18.27	24.0	3.48	34.0	−2.77	15.6	−3.31
	36.6	−5.17	22.7	2.18	40.0	3.23	17.8	−1.11
	37.1	−4.67	18.5	−2.02	41.8	5.03	13.3	−5.61
	52.4	10.63	23.2	2.68	44.0	7.23	17.2	−1.71
	47.0	5.23	41.5	20.98	29.6	−7.17	26.3	7.39
	22.3	−19.47	21.3	0.78	24.3	−12.47	14.1	−4.81
	57.1	15.33	10.3	−10.22	49.4	12.63	24.8	5.89
Total	626.5		307.8		551.6		283.6	
Numbers of Animals	15		15		15		15	
Mean	41.77		20.52		36.77		18.91	

*　ISt………International Gonadotrophin Standard

**　iu………international unit

***　NSt………Serum Gonadotrophin Standard of Japanese Pharmacopoeia

Table 2～4から2－2用量検定法で計算を行うとTable 5となる．

Table 5.

	Table 2	Table 3	Table 4
I	0.310	0.3010	0.3010
E	11.55	16.88	19.56
F	−1.41	−3.00	−3.31
b	38.37	56.08	64.98
M	−0.0367	−0.0535	−0.0509
R	0.919	0.884	0.890
S^2	76.54	183.72	129.04
V	5.47	13.12	8.60
t	0.338	0.584	0.578
A＝V	5.47	13.12	8.60
B	60.38	144.81	94.92
g	0.1654	0.1857	0.0903
logF.L.E.	1.8573～2.1281	1.8418～2.1338	1.9084～2.0916
F.L.E.%	72.0～134.3	69.5～136.1	81.0～123.5

3回の測定値を平均すると R＝0.8977，日局標準品 1mg＝1.8単位（＝国際単位）となる．又重みを加えた平均値($\bar{R}$)を求めると Table 6 のとおりである．

Table 6.

	M	$w=4t^2/L^2$*	wM
Table 2	−0.0367	220.33	−8.0861
Table 3	−0.0535	189.09	−10.1152
Table 4	−0.0509	478.10	−24.3353
	Total	887.50	−42.5366

$\bar{M}=\sum(wM)/\sum w=-0.0479$

$\bar{R}=\mathrm{antilog}\bar{M}=0.8957$

$*L\cdots\cdots\left\{t\sqrt{A(1-g)+B\bar{M}^2}/b(1-g)\right\}\times 2$

日局標準品1mg=1.8単位（=国際単位）となる．

むすび

血清性性腺刺戟ホルモンを稀アルコールに溶かして乳糖と混和し，デシケータ（五酸化燐）中で減圧乾燥し日局標準品とした．日局標準品の力価は国際標準品を用いて3回検定を行つた結果を平均して1mg=1.8単位（=国際単位と定めた．又重みを加えた平均値からは1mg=1.8単位（=国際単位）である．

文献

1) 第二改正国民医薬品集，231 (1955)，
2) Pharmacopoea Internationalis, Editio Prima, Volumen 1, 263 (1955).
3) British Pharmacopoea, VIII, 815 (1953).
4) 長沢佳熊，越村栄之助，岡崎精一：衛生試験所報告，73，25 (1955).
5) 第二改正国民医薬品集，追補2，5 (1956).
6) 長沢佳熊，越村栄之助，岡崎精一：衛生試験所報告，75，135 (1957).
7) Pharmacopoeia of USA, XV, 879 (1956).

Summary

The serum gonadotrophin was disolved in diluted alcohol and mixed with lactose, the mixture was dried under vacuum over phosphorus pentoxide and adopted as the serum gonadotrophin standard of the Japanese Pharmacopoeia. The potency of the standard was found 1.8 unit, the weighted mean of which was 1.8 unit per mg, by the British Pharmacopoeia rat assay method using the International Standard of Serum Gonadotrophin.

Received June 18, 1957

食品着色料の食品衛生学的研究（第1報）特にローダミン，オーラミン，マラカイト緑の食品着色実態と消化酵素に及ぼす影響

青山好作， 宮沢文雄 八田貞義*， 大竹佐左衛門*，浦部幹雄*
酒井雄学*藤田昭丸*

Hygienic Studies on Food Dyes. I.

Kōsaku Aoyama, Fumio Miyazawa, Sadayoshi Hatta,
Sakuzaemon Ōtake, Mikio Urabe, Yugaku Sakai,
and Akimaru Fujita.

まえがき　飲食品の美化或は天然食品の色彩の模倣などから，古くより人工的に特定の着色料の添加が行われている．これは飲食品の色調が嗜好や食欲などに影響されるためもあるが．なかには単に習慣的に行われるものもある．わが国では食品衛生法により24種のタール色素の着色料は今日といえども法定外の着色料を使用した日常飲食品が多数散見され，時にはこれによる中毒例[1]も報告されている．

著者らは市販飲食品の法定外着色料のうち，その検出頻度の比較的高いローダミン（赤色々素），オーラミン（黄色々素）およびマラカイト緑（緑色々素）について，食品衛生学的な見地から種々検討を試みたので，以下その成績について報告する．

1. 法定外着色料使用の実態

法定外着色料の使用される主な原因は，それの添加が特定の食品ではむしろ一層鮮麗さが向上し，使用法も比較的簡便で，日光や熱に対して安定で永く変色しない．また価格が安価でノビが利くなどの原因が一応考えられる．

市販での使用実態の調査は特に東京および大阪と大消費地に求め，これらの成績を基に集計した．この検体検査は東京都[2]および大阪府[3]に於て実施した．

この調査成績は第1表その1に示す如く，不適品の中の有害色素としては，ローダミン(42.6%）の検出が主位を占め，次いでオーラミン(22.5%)，マラカイト緑（3.8%）の順で，使用度数はローダミンで飲料類よりも菓子類，飴類，佃煮類に多く，オーラミンでは一般食品，飴類，菓子類の順になつており，マラカイト緑では佃煮類に多く認められる．一般食品の内訳では沢庵よりの検出がきわだつており，昭和25年2月より昭和26年5月までの期間，96件について検査した結果では約80%に及んだ．一方大阪では比較的消費高の高いデパート・マーケットなどを対象としているが，検査件数の過半数は不良飲食品を販売しており，法定外着色料ではローダミン，オーラミン，マラカイト緑などは上位を占めており，東京の成績と類似していた（第1表その2参照)．これらの成績は当局の検査目標，指導方針などにより検査対称の差異などのため或る程度の偏重は免れないが一応の判定資料には役立つといえる．

なお紙面の都合上詳細の表は割愛する．

第1表　その1　　市販飲食品の着色料（東京都）　　昭24～28年

区分	飴類	菓子類	佃煮類	一般食品	着色料	清涼飲料	食器及玩具	焼酎	酒類	その他	計
ローダミン	587	550	230	27	63	4	5				1,466
ローダミン オーラミン	66	36	21	1	4						128
オーラミン	232	194	24	206	56	2	2				716
塩基性色素	181	139	82	18	115	37	1			5	578

註　*　日本医科大学衛生学教室

区分	飴類	菓子類	佃煮類	一般食品	着色料	清涼飲料	食器及玩具	焼酎	酒類	その他	計
マラカイト緑	8	24	66	4	36	4					142
ゲンチアナ紫	10	3			3						16
ホルマリン	8	11	2	17			5	117	5		165
メタノール						2		225	21		248
ホルマリン メタノール								156	4	1	161
その他	3	9	2	9	27	30	8			36	124
計	1,095	966	427	282	304	79	21	498	30	42	3,744
ローダミン検出率（%）	59.6	60.6	58.8	9.9	22.1	5.1	23.8	0	0	0	42.6
オーラミン検出率（%）	27.2	23.8	10.5	70.4	13.1	2.5	9.5	0	0	0	22.5
マラカイト緑検出率（%）	0.7	2.4	15.4	1.4	11.8	5.1	0	0	0	0	3.8

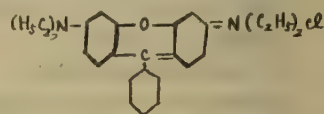
第1表　その2　　検出法定外着色料別

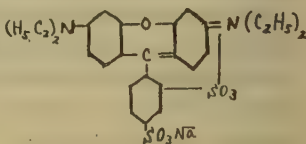
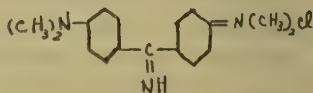
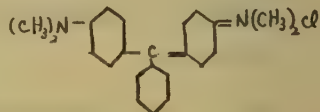
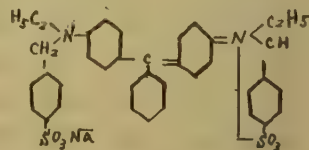
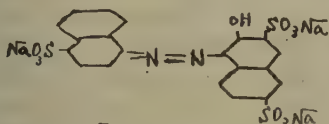
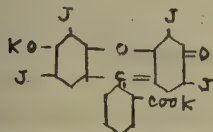
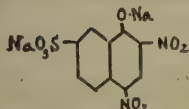
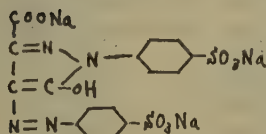
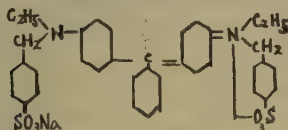
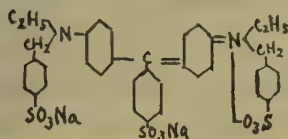
色別	検出法定外着色料名	検出件数
赤色	ローダミン マゼンダ	192 2
黄色	オーラミン マルチェスイエロー メチニールイエロー	134 2 6
緑色	マラカイトグリン ナフタリングリン ミーリンググリン	10 33 3
青色	パテントブルウ レオナールブルウ ダイレクトブルウ	23 22 17
黒色	ダイレクトブラック ロクセリン	4 1

2.　供試着色料の化学構造[4-5]

実験に選んだ着色料は赤色々素ではローダミン，スルフォローダミン，黄色々素ではオーラミン，緑色々素ではマラカイト緑，ブリリアントミーリング緑の計5種である．

なお対称として赤色々素では食用赤色2号（アマランス），3号（エリスロシン），黄色々素では食用黄色1号（ナフトールイエローS），4号（タルトラジン），緑色々素では食用緑色1号（ギネア緑）2号（ライト緑 SF黄）の計6種を用いた．

供試薬剤の化学構造式

Rhodamine B

Sulphorhodamine B

Auramine O

Malachite green B

Brilliant milling green

Amaranth

Erythrosine

Naphthol yellow S

Tartrazine

Guinea green B

Light green SF yellowiph

3. ローダミン，オーラミン及びマラヒット緑に就いての食品衛生学的研究

1） 市販食品中の法定外着色料含量

食品の色彩は殆んど嗜好を基として経験的に配合されている関係上，定量的な比率を保つて製せられる様な場合が少く，従つてどの食品にどの程度に着色料が含有されているかという事は詳にされていない．そこでローダミン，オーラミン及びマラカイト緑について，検出率の比較的多かつた食品を代表に選び食品中の含有量を検べて見た．

実験方法

a） **ローダミン** 検体には金花糖，ラムネ糖，風船飴，玉飴などを選んで用いた．定量法は夫々の検体をまず粉砕し5g宛正確に秤量し，これに2％水酸化ナトリウム液10ccを加え，僅かずつ加温しながら振盪し，完全に溶解させる．次にエーテルを等量加え十分振盪後エーテル層を分液する。この時のアルカリ層に再びエーテルを加え，同じ操作を計3回繰返し，夫々のエーテル層を集め微温浴中でエーテルを蒸発させる．完全に蒸発させてから蒸留水5ccに溶解し，この溶出液を同じ方法で操作したローダミン標準液と比色定量して添加濃度を求めた．定量にはいずれの着色料に就てもA. K. A.光電管比色計を用いた．

b） **オーラミン** 検体には沢庵を選び沢庵からのオーラミンの溶出には溶媒に体液として健康人胃液（pH 2.3游離塩酸々度は17）及び十二指腸液（pH8.2）を，試薬としてはpH3（醋酸，醋酸ソーダ緩衝液）pH7及びpH8の燐酸緩衝液と1％醋酸液を用いた．定量の方法はまず沢庵50gを細く切つて溶媒50cc中に浸し，37°の恒温槽内に30分作用させた後この浸出液に10％水酸化ナトリウム液をpH9になるまで滴加してオーラミンを析出させ，これにエーテルを混和してよく振り混ぜて完全にエーテルに移行させ更に1％醋酸液に溶出させる． この溶出液を同じ方法で操作したオーラミン標準液と比色定量して添加濃度を求めた．

c） **マラカイト緑** 検体には昆布とわかめとを基に実験した．

昆布：上水1.5lにマラカイト緑 50mg を入れて良く溶解させた後昆布 156g を加え加熱を続け程良く染上つたら昆布をとり出し，直ちに残溜液を秤量(900cc)し，この残溜液に2％水酸化ナトリウム液及びアミールを加え抽出し，更に1％醋酸溶液に転溶せしめ，この操作を3回繰り返し，その水層を集めて比色定量し着色された量を換算した．

わかめ：上水1.5lにマラカイト緑10mgを入れて良く溶解させた後，わかめ 156gを加え，加熱し，程良く染上つたらわかめを取り出し直ちに残溜液を秤量（1350cc）し，この残溜液から昆布と同様の操作で色素を抽出した．

実験成績

ローダミンの食品中の含有量はその種類によつて差異が認められるが， 同一の食品では製造ロットを異にするものでも比較的近似した値を示した．検体1g中の平均値をみると，金花糖では 43.7γ，ラムネ糖 29.1γ，風船飴 1.78γ，玉飴21.5γとなる（第2表その1参照）．オーラミンの沢庵中の含有量をみると，実験は溶媒に十二指腸液を用いた時は2回，その他のものでは5回行つたが，オーラミンは一般的にその液性が中性乃至アルカリ性のものよりも酸性の場合によく溶出する．沢庵 50g中から溶出する量（平均値）は胃液，pH3 緩衝液及び1％醋酸液では0.32～0.46mg，十二指腸液では0.22mg，pH7では0.26mg，pH8では0.27mgであつた．そこでこの沢庵か

らの溶出量が実際に沢庵に添加してあるオーラミン量の何%にあたるかを検べた．沢庵類の方法には現在二通りある，A法（仮称）は生大根を下漬する時，大根32貫に対しオーラミン3匁を加えて漬込み，次の本漬には大根32貫に対しオーラミン2匁を加えて漬上げる方法で，B法（仮称)は下漬の時にはオーラミンを加えず，本漬の時に大根11貫に対し2匁の割合に添加して1回の添加で漬上げる方法である．これを基準として計算すると沢庵50g中にはA法では7.8mg，B法では8.6mg添加されている事になる．そこで著者らの行つた溶出試験の結果と較べると溶出量の多い酸性域では，添加量の約3～5%，中性域では約3%，アルカリ性域では3～3.5%となる．しかし住江[6~7]によると，オーラミンの沢庵に吸収される量を検べた時の成績によると，沢庵にはオーラミンの添加総量の6～7%前後が吸収され，93～94%の大部分は移行されないといつている．この割合からゆくと沢庵50g中にはA法では1.3mg（6%として），B法では1.5mg含有される事になるので溶出率は酸性域では約21%となる．いずれにしても沢庵を食べた場合，胃液などの酸性液と共存するとよく溶出するが，作用時間が30分程度では添加したすべての量が溶出するまでには至らない様である．（第2表その2参照）．

第2表その1　ローダミン含量

番号＼検体	金花糖	ラムネ糖	風船飴	玉飴
1	56.8	25.7	1.8	24.0
2	56.2	30.0	1.3	21.4
3	26.0	33.5	1.8	15.5
4	51.5	30.5	2.0	23.5
5	28.0	25.5	1.6	23.0
平均	43.7	29.1	1.7	21.5

註　単位はγ/gとす．

第2表その2　市販沢庵からの「オーラミン」溶出量

検体＼溶媒		胃液 (pH2.3)	十二指腸液 (pH8.2)	緩衝液 pH3	緩衝液 pH7	緩衝液 pH8	1%醋酸液
K. 1		0.50	0.25	0.54	0.30	0.26	0.56
K. 2		0.24	0.20	0.26	0.18	0.17	0.26
K. 3		0.31	—	0.54	0.44	0.60	0.84
K. 4		0.18	—	0.30	0.20	0.16	0.22
K. 5		0.32	—	0.44	0.16	0.16	0.44
平均値		0.32	0.22	0.42	0.26	0.27	0.46
添加量に対する溶出量の比(%)	A法(7.8mg)	4.1	2.8	5.3	3.3	3.4	6.3
	B法(8.6mg)	3.7	2.5	4.6	3.1	3.1	5.3

マラカイト緑では昆布或はわかめを染色後の残溜液中の全色素量を測定し，これより初めに使用した色素量から推定してみると，昆布では染色後の残溜液中の全色素量は1.206mgで，これより初めに使用した色素量から推定して昆布吸収（推定）色素量は48.8mg/156g（0.313mg/g）といえた．わかめでは染色後の残溜液中の全色素量は1.80mgで初めに使用した色素量から推定してわかめ吸収（推定）色素量は9.2/156g（0.059mg/g）といえた．

2. ローダミン，オーラミン及びマラカイト緑の防腐力

食品の着色に使われる色素では安定した鮮麗な色彩のほか，食品に共存する細菌の発育に障害を与える．そこで著者らも食品に使われやすい着色料について抗菌活性能を検べた．

実験方法　供試着色料は赤色々素ではローダミン，スルフォローダミン，食用赤色2号（アマランス）及び3号(エリスロシン6G)，黄色々素ではオーラミン，食用黄色1号（ナフトールイエローS）及び4号（タルトラジン），緑色々素ではマラカイト緑，ブリリアントミーリング緑，食用緑色1号（ギネア緑)及び2号（ライト緑SF

黄）の計11種で供試菌種はグラム陽性菌4株，グラム陰性菌6株，糸状及び菌酵母菌9株（オーラミンでは沢庵変敗菌4株を用いた）の計23株である．基体培地は分裂菌の時はカゼイン水解培地を，糸状菌，酵母菌ではCz-Dox培地を，沢庵変敗菌ではビール酵母エキス100g，ポリペプトン10g，ブドウ糖10g，塩化ナトリウム0.01g，第1燐酸カリウム0.5g，第2燐酸カリウム0.5g，塩化安門3g，硫酸マグネシウム0.2g，硫酸0.2g，硫酸第1鉄0.01g，蒸留水1l，pH無修正のものを用いた．菌移植後は夫々適温に7～10日間培養し，この時の培地の溷濁或は菌糸の発育の状態によつて検べた．

実験成績　供試着色料の中には特に強い抗菌力を示すものもあつたが，その詳細は紙面の都合上割愛し第3表にその成績を示した．

第3表　　各種着色料の防腐力

	供試菌 ＼ 供試色素	Rhodamine	Sulphorodamine	Amaranth B	Erythrosin6G	AuramineO	Naphthol yellowS	Tartrazine	Malachite green	Brilliant milling green	Guinea green	Light greenSF yellowish
Bacteria	M.P.V.aureus (FDA209p)	10.000	5,000	<1,000	1,000	<2,000	<2,000	<2,000	>300,000	<8,000	<8,000	<8,000
	B. mesentericus	<1,000	<1,000	<1,000	<1,000	<2,000	<2,000	<2,000	8,000	<8,000	<8,000	<8,000
	B. subtilis(G66)					3,000	<2,000	<2,000	>300,000	<8,000	<8,000	<8,000
	B. subtilis					3,000	<2,000	<2,000	>300,000	<8,000	<8,000	<8,000
	S. paratyphiA					<2,000	<2,000	<2,000	10,000	<8,000	<8,000	<8,000
	S. typhi(S.58)	1,000	<1,000	<1,000	<1,000	<2,000	<2,000	<2,000	100,000	<8,000	<8,000	<8,000
	E. coli communis	1,000	<1,000	<1,000	<1,000	<2,000	<2,000	<2,000	100,000	<8,000	<8,000	<8,000
	A. aerogenes					<2,000	<2,000	<2,000	<8,000	<8,000	<8,000	<8,000
	Prot. vulgalis	1,000	<1,000	1,000	<1,000				100,000	<8,000	<8,000	<8,000
	B. prodigiosus	<1,000	<1,000	1,000	<1,000	<2,000	<2,000	<2,000	50,000	<8,000	<8,000	<8,000
Fungi & yeast	Aspergillus niger								>300,000	<8,000	<8,000	<8,000
	Aspergillus uianus								>300,000	<8,000	<8,000	<8,000
	Aspergillus oryzae	<1,000	<1,000	<1,000	<1,000				100,000	<8,000	<8,000	<8,000
	Penicillium(Q176) chrysogenum								>300,000	<8,000	<8,000	<8,000
	Penicillium SP (GM)	<1,000	<1,000	<1,000	<1,000				>300,000	<8,000	<8,000	<8,000
	Monilia albicans	<1,000	<1,000	<1,000	<1,000				>300,000	<8,000	<8,000	<8,000
	Willia anomala	<1,000	<1,000	<1,000	<1,000				>300,000	<8,000	<8,000	<8,000
	Saccharomyces Sake	<1,000	<1,000	<1,000	<1,000							
	Torula	<1,000	<1,000	<1,000	<1,000							
	沢庵変敗菌					5,000	<2,000	<2,000				
	〃					5,000	<2,000	<2,000				
	〃					10,000	<2,000	<2,000				
	〃					5,000	<2,000	<2,000				

註　表中数値は菌発育阻止力を示す．

4．ローダミン，オーラミン，マラカイト緑の消化酵素に及ぼす作用[8-10]

酵素の消化作用は一定の理化学的要約によつて影響を受けるが，特定の色素の混在によつても酵素作用に変化を来す事がWeber[11]（1896）により見出され，その後Winogradow（1903），Gudemann[12]（1905）Meyer（1909）等もパンクレアチンのフィブリン消化作用或はペプシンのフィブリン，カゼイン及びアルブミンなどの蛋白消化作用が何れも一定の色素により障害される事を確定し注目されている．

実験方法　a）膵アミラーゼ：予め試験管に1％可溶性澱粉溶液（Merck製）5ccを分注しておいて，この5cc

中に色素が所定濃度に加えられる様に調製した．次に夫々生理食塩液1.0ccとpH6.8,1/3mol 燐酸緩衝液1.0ccとを加え，最後に200倍犬膵液（犬膵液の20倍のグリセリンに貯蔵しておいたものを使用前に1％燐酸アンモンで10倍に稀釈した）を各々の1.0cc量を速かに加え充分に混和させた後38°の恒温槽内に30分放置させる（この間，時々内容を振盪撹拌した）．これを所定時間毎に取出し氷水中に放置して酵素作用を不活化しておいて Hagedon-Jensen法により還元糖量を求めた．

b） 膵リパーゼ：Tributilin 飽和水溶液 50ccに供試着色料を加えた組を作り，これを実験群とし，これに対照群として着色料を加えない組を作つた．その各々の組ごとに pH7.6，1/3mol 燐酸緩衝液を加え 25°の恒温室（湿度55％）内に一定時間放置後「スタラグノメーター」で先ず酵素作用前の滴数を実測した．その後に夫々200倍犬膵液2ccを加え充分に混和させて酵素を作用させ，作用 15′，30′，45′，及び 60′ 後にその一定量を採つて「スタラグノメーター」を用い消化状態を点滴により測定した．

実験成績 a） 膵アミラーゼ：赤色々素の膵アミラーゼに対する作用はローダミンでは 20mg/50cc 量以上が含有されると作用15′の観察時においても明瞭に抑制像がみられ作用濃度が増すにつれて障害の度合も強い．これに対し，スルフォローダミンではむしろ対象的で 2mg/50cc 量以上が溶存すると，比較的短時間（15分）では刺戟的に作用し，この現象は濃度が高まると亢つた．しかしこの作用も一時的で作用30分後では 40mg/50cc 量以上の時にのみ刺戟的に働いた．アマランスでは酵素作用に対して拮抗的にも，促進的にも作用しない．オーラミンでは沢庵に含有されている濃度（0.85mg/50g）及びその20倍の濃度であつても特記すべき影響は与えず，促進的にも抑制的にも働かない．マラカイト緑では作用15分では50mgでも酵素作用を促進も抑制もしないが，そのまま作用を続けると5mg量以上の場合はむしろ促進的となり，30分作用時には明瞭に観察された．ブリリアントミーリング緑では供試濃度範囲では作用の亢進も拮抗もみられない．

b） 膵リパーゼ：ローダミンでは添加濃度が増加すると，対照に較べて基質量は増加したが，同時にリパーゼの抑制作用の増減となつた．スルフォローダミンは2mg量と 80mg 量とでは幾分の差はみられるが対照に較べると殆んど抑制も促進もしない．アマランスでは少量（2mg，20mg量）では抑制的に，多量（40mg，80mg 量）では逆に促進的に作用した．オーラミンでは供試濃度が高まるにつれて徐々にその酵素作用は抑制された．タルトラヂンでは供試濃度域では酵素作用には全く影響を与えなかつた．マラカイト緑及びライト緑 SF 黄では5mg量以下の量ではリパーゼの消化作用を促進も抑制もしないが10mg量以上に溶存すると促進的に作用した．ブリリアントミーリング緑及びギネア緑では比較的微量（10mg量以下）では刺戟的に作用したが，大量（50mg)ではむしろ抑制的に作用した．

以上消化酵素に対する着色料の影響の実験成績の表は紙面の都合上割愛した．

総　括

飲食品に色彩を施し，市販する事は消費者の嗜好も考慮して古くから行われているが，着色に用いる色素がもともと繊維類の染色剤として製造されたものをそのまま応用されているため，中には衛生上有害な着色料も利用されており，又昭和22年以前は有害性着色料取締規則が一般食品の着色には，ピクリン酸，ヂニトロクレゾール及びコラリン以外のタール色素ならば自由に使用が許されていた為，今日といえども市販飲食品の中には法定外着色料を使用したものが散見され，中毒例の報告もみられる現状である．許可色素（総て酸性色素）が歓迎されず法定外色素（主に塩基性色素）が乱用される要因には幾多あるが，前に述べた如く色彩の鮮麗性や安定性，経費の安価な点，長い間の習慣，使用法の簡便さなどといえよう．要するに従来のものに代え得る優秀な着色料が見出されない事に基因するのではなかろうか．著者らが塩基性色素の使用実態調査を東京及び大阪の大消費地に求めて検べた時の成績をみても，東京，大阪共に違反件数はローダミン，オーラミンが主位で，次いでマラカイト緑，ナフタリン緑，パテント青などの検出率が高かつた．飯田，生島[13]が兵庫県下の市販飴類158品目，386種にした結果は，法定外着色料を混合或いは単独で使用したものが189種48.97％で全体の約半数に及び，このうちロついて試験ーダミン，オーラミン及び両者の混合が大部分で，その使用頻度は両者合せて78.63％といい，本田[14]は宮崎市内の市販生菓子，駄菓子105件中の着色料について検べ，赤色40件中31件が検出され約77.5％で主位をしめ，次がオーラミンの44.4％，緑色20.8％，紫色50％と報告しておりローダミン，オーラミンなどの乱用は全国的な観がある．田村，東福寺[1]らはローダミン含有の食品によつて中毒した事例を報告している．着色料の適

否は化学的純度と共に生物学的純度特に毒性に左右されるが，この毒性も中毒量と実際の使用量との相関性によつて又異る．そこで飲食品中にどの程度含有されているかを知ることは，生体中毒量，中毒機作などを究明するに重要な指針となるのでこの点について究明してみた．この結果は市販菓子中のローダミン含量は金花糖では43.7γ/g，ラムネ糖では29.1γ/g，玉飴では21.5γ/gで，大体40γ/g前後であつた．オーラミンでは沢庵中の含量について検べたが，沢庵に使うオーラミンの含量は生産地（長野，山梨など）により幾分異るが，現在は大体A法，B法（いずれも仮称，詳細は前述した）により行われている．この二法を規準として沢庵中のオーラミンの含量を算出すると，沢庵50g中にはA法では7.8mg，B法では8.6mg添加されていることになる．しかし住江の報告[7]によれば沢庵を漬け込む時，実際にオーラミンは添加量の6～7％前後が吸収されるだけで大部分は未吸収のまま糠の部分に残るという．従つて実際には上記の値より遙かに少い事になる．一方マラカイト緑については昆布，わかめの加工業者と協同し日常慣習的に行われる方法を実施し逐一化学的に定量したところ，マラカイト緑の昆布着色量（推定）は0.313mg/gわかめでは0.059mg/gと実測された．現在はローダミン，オーラミン，マラカイト緑共にその使用は厳しく禁じられているため，加工業者はこれに代る安定した着色料の出現を切に要望している．著者等はこれに代るものとして赤色々素ではスルフォローダミン，緑色々素ではブリリアントミーリング緑を選び比較検討を進めた．食品着色料は第一条件として生体に無害でなければならない事が望まれるが，この毒性生体障害機作を究明する前に着色料の防腐力並びに消化酵素に及ぼす作用について検討した．

供試着色料の防腐力はいずれも菌発育阻止力が菌種によつて特異的であるが，赤色々素ではローダミンが若干一部の菌に抑制能を示したに止まり，緑色々素ではマラカイト緑は大部分の糸状菌，グラム陽性菌に有効に作用したほかは他の供試色素は供試菌の発育を許し阻止し得なかつた．黄色々素ではオーラミンは沢庵変敗菌に特異的に作用し興味深い．沢庵の色素（ナフトールイエローS）変色の原因について芥田，大葉，伊福[15]は①色素が酸性又はアルカリ性で変色する性質がある場合．②大根中の酵素又は化学的成分が関係する場合．③習慣上混用しているウコン粉（Jurmesic powder）に原因がある場合．④米糠成分に直接原因がある場合．⑤製造中微生物が繁殖する場合の五要素を指摘しているが種々の実験の結果変色原因は米糠，ウコン粉，大根等の原料中の成分及び酵素に存せず，細菌に基因する事を明らかにし，この基因菌として B. mycoides, B. fluorescens, B. pyocyaneus, B. natto などを挙げている．著者は農業大学住江研究室より沢庵変敗菌の分与を受け検べたところ，オーラミンは良好な抗菌活性を示した．従つてオーラミン着色沢庵が比較的変色変質しにくいのは或いはその素因にオーラミンの防腐力も見逃せない現象といえる．オーラミン以外のナフトールイエローS．タルトラジンなどは防腐力は期待出来なかつた．又これ等で着色した沢庵は変色変質しやすいといわれる．供試着色料の消化酵素に対する影響についてみると，膵アミラーゼに対してはローダミンは供試濃度の増加と共に抑制も増加したが，スルフォローダミンでは一時的ではあるが刺戟的に作用する．オーラミン，ブリリアントミーリング緑は供試濃度域では酵素作用を促進も抑制もしないが，マラカイト緑ではむしろ促進的に作用した．膵リパーゼに対してはローダミン及びオーラミンでは抑制的に作用し，ブリリアントミーリング緑では比較的微量では刺戟的に大量ではむしろ抑制的に作用した．スルフォローダミンは抑制も促進もしないが，マラカイト緑では比較的大量では促進的に作用した．

終りに臨み貴重な資料を心よく御呈示下された都立衛生研究所，大阪府立衛生研究所食品係に感謝します．また犬膵液を御分与下された日本医科大学行徳教授に深謝します．なお実験に際し種々御教示下された当試験所藤井博士に感謝すると共に貴重な菌株を御分与下された東京農業大学住江教授に御礼申上げます．

文　　献

1) 田村，東福寺：日本医事新報，1414，12 (1951).
2) 東京都報告集より引用.
3) 大阪府報告集より引用.
4) Colour index (1941).
5) Farbstofftabellen Gustan. Van Gustan Sehnlts Leipzig (1939).
6) 住江：日清情報 (1952).
7) 住江：昭和26年日本農芸化学会12月例会口演.

8) 丸野：実験消化器病学雑誌，3，9 (1918).
9) 丸野：実験消化器病学雑誌，3，21 (1918).
10) 丸野：実験消化器病学雑誌，3，32 (1918).
11) Weber. H. A., *J. A. Chem. Soc.*, 18, (1902). は丸野：実験消化器病学雑誌，3，87 (1918) より引用
12) Gudemann. E., *J. A. Chem. Soc.*, 27, 1436 (1905).
13) 飯田，生島：第8回日本公衆衛生学会総会口演 (1953).
14) 本田：第8回日本公衆衛生学会総会口演 (1953).
15) 芥田，大葉，伊福：兵庫県立農業試験場報告 (1950).

Summary

It was known that the legal colour matters having been most frequently used for the foodstuffs on the market were Rhodamine, Auramine and Malachite green.

Therefore, from hygienic point of view on foodstuffs, results explained on their contents in food their antisepsis and their actions on digestive enzymes were described.

Received June 18, 1957.

食品着色料の食品衛生学的研究（第2報）特に急性及び慢性中毒量と生体臓器親和性について

青山好作，宮沢文雄，八田貞義*，小田幸子*，浦部幹雄*
酒井雄学*，藤田昭丸*

Hygienic Studies on Food Dyes. II.

Kosaku AOYAMA, Fumio MIYAZAWA, Sadayoshi HATTA, Satiko ODA,
Mikio URABE, Yugaku SAKAI, and Akimaru FUZITA.

まえがき　著者らは前報[1]に於て市販飲食品中より検出率の高いローダミン，オーラミン，マラカイト緑について食品衛生学的見知より食品中の含有量，着色料の防腐力および消化酵素におよぼす作用などについて究明したが，着色料の良否は化学的な純度と共に生物学的な純度特に毒性によつても査定されるべきで，特に食品着色料は第一条件として生体に無害なことが望まれる．そこで著者らは，マウスおよびラットを基に急性中毒致死量および慢性中毒量を実測して，致死因障害機作などについて究明してみた．

実験方法

1．**急性中毒致死量**　実験には健常マウス（平均体量 15.4g）を選び6～8匹を1群とし，供試着色料にはローダミン，スルフォローダミン，オーラミン，マラカイト緑およびブリリアント緑の5種と対照に選んだ食用赤色2号，3号，食用黄色1号，4号，食用緑色1号，2号の計6種である．いずれも経口的に投与し，このときの急性中毒致死量は Van der Waerden の面積法にて求めた．実験動物は短時日間に中毒死したもの及び3日間以上生存した動物の一部を撲殺し，病理組織学的に追究し生体臓器との親和性を観察した．

2．**慢性中毒量**　供試動物にラット（平均体量 93g）を用い，その飼育は砕大麦を主食とし，副食に野菜（キャベツ，人参，魚粉及び$V.B_1$末を混ぜて与え，体量の増加するにつれて給与量を増加した．実験にはラット5匹を一群としアラビアゴム1%液に混和させた色素液を胃ゾンデをもつて経口的に胃内に直接投与した．
供試着色料は赤色々素ではローダミン，スルフォローダミン，黄色々素ではオーラミン，緑色々素ではマラカイト緑及びブリリアントミーリング緑の計5種である．投与量は夫々後に詳記したので割愛する．

実験，対照群とも1日1回宛90日間連続投与し，実験中は隔日毎に体重を測り，同時に採食排泄物などに留意して生育状態を観察し，所定日数毎に撲殺して病理組織学的に究明した．

実験成績

1．急性中毒量と生体臓器親和性

@　急性中毒量　健常マウスに対する経口投与法によるときの各着色料の50%致死量（LD_{50}）はローダミンが最も毒性強く，そのLD_{50}は0.174±0.0115g/kgで，次いでマラカイト緑の0.2186±0.0223g/kg，オーラミンの0.48±0.025g/kg で，ローダミンはオーラミンに較べると約28倍も強い．これに対してスルフォン基を導入したスルフォローダミンの毒性は著明に減弱し，そのM.L.Dは20g/kg で母型である，ローダミンのM.L.D.0.2g/kgに較べ約1/100倍に逓減しており興味深い．ブラリアントミーリング緑は M.L.D.10g/kgで毒性は比較的軽微である．食用許可色素では毒性が5g以上のものは赤色2号のM.L.D.40g/kg，黄色4号のLD_{50} 12.75±1.4g/kg，緑色1号LD_{50} 12.4±1.1g/kg，緑色2号LD_{50} 9.1±1.1g/kgで，黄色1号では2.23±0.26g/kg，赤色3号は0.255±0.012g/kg と実測され，前者の食用色素類に較べ比較的毒性が強い，そこで同一実験を繰返して再確認する一方F社製の最純品及びナショナルアニリン会社製のものを検べた結果，食用色素中では比較的毒性は強い部類に属すが，中毒量はF社製のものはLD50 1.26±0.129g/kg，ナショナルアニリン製のものにはLD50 2.35±0.130g/kg

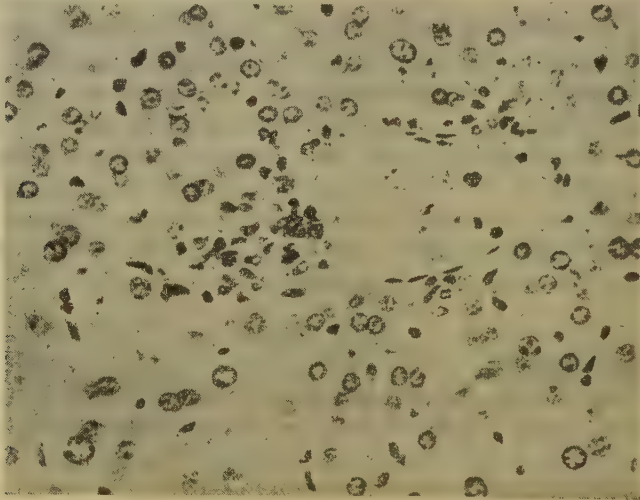
註　*　日本医科大学衛生学教室

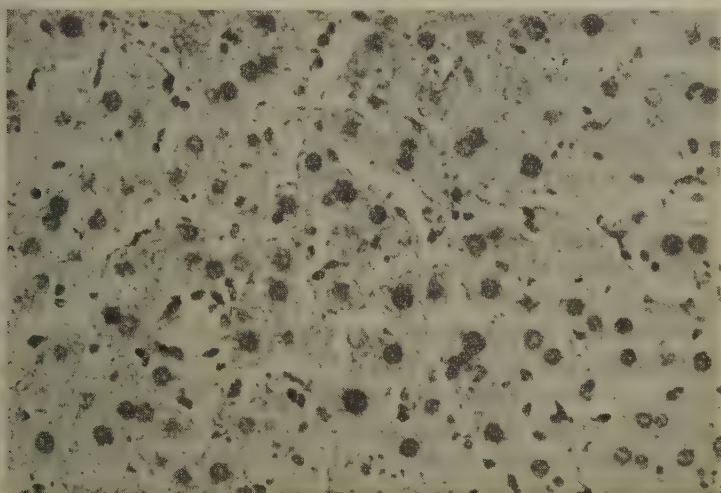
と前述のものよりは幾分少いことが解つた.

ⓑ 生体臓器親和性　急性中毒マウスの生体臓器との親和性をみるとローダミン投与では主な病変は実質変性と循環障害である．即ち 0.8g/kg 投与死亡マウスでは肝臓は鬱血強く，原形質は顆粒状崩壊し，核は濃染，核崩壊あり，又軽度の脂肪化がみられた．この外脾臓，腎臓では鬱血強く腎臓では細尿管上皮が，心臓では心筋繊維の溷濁がみられた 0.1g/kg 投与群で投与3日目に撲殺したときの所見は，0.8g/kg 投与時の成績と大体類似しているが，肝臓に於ては所々に肝細胞の壊死を認めるものがあり，このほか内皮細胞，星細胞の腫大するのがみられた．スルフォローダミンでは各臓器とも鬱血が強く，肝臓では厚形質は崩壊し植物細胞様変化がみられた．脾臓では鬱血と出血が比較的強く胚中枢では核変性が著しい，腎臓では細尿管上皮細胞の溷濁もみられた.

オーラミン投与による主なる病変部位は肝臓と腎臓で 0.8g/kg 投与マウスの肝臓は一般に肝細胞は溷濁し原形質並びに核は共に濃縮し暗細胞が散在，少数の有糸核分裂及び細胞浸潤巣を認める．腎臓は一般に細尿管の桿状構造が乱れ，ところにより顆粒状或は空胞変性を起している．又所々にアザン染色で濃赤染する上皮がある.

脾臓には著変なく，心臓には一部心筋繊維の鬆粗化した部分がある．病現所見は投与量が減少するにつれて幾分軽度となつている.

マラカイト緑投与では主変臓器は肝臓，腎臓，脾臓で大量投与群（0.5g/kg）投与の肝臓では肝細胞の溷濁腫脹と核の中等度の淡染消失がみられ，星細胞は軽度に腫大している．腎臓は細尿管上皮細胞の軽度の溷濁腫脹，巣状小出血と核濃縮及び消失を認め，脾臓では軽度の脾髄増生及び細網細胞の増大，増殖を認めた．この他腸管の軽度の毛細管拡張，心臓における心筋繊維の溷濁，核の濃縮，肺臓の軽度の鬱血を認めた．1回の投与量が少くなると毒性も幾分軽くなり，0.05 g/kg 投与し生存したマウスを撲殺して較べたところ，肝臓（写真1参照）腎臓，脾臓に夫々実質変性を認めるが 0.5g/kg 投与時より軽減した．ブリリアントミーリング緑投与ではマラカイト緑の所見と比較的類似し（写真2参照）．腎臓では20g/kg投与では強度の細尿管上皮細胞の溷濁腫脹，核変性を認めたが．5g/kg投与でもその所見は強度に認められ核の淡染消失著明で巣状出血を認めるに至つた.

1. マウス肝臓　（マラカイト緑 0.05g/kg投与）

肝細胞の強度の腫大，空胞化，核の消失星細胞の軽度の腫大，門脈鬱血.

2. マウス肝臓（ブリリアントミーリング緑 8g/kg投与）
肝細胞の軽度の変性，核の淡染，消失.

一方肺臓では投与量が少く（5g/kg量）なると鬱血も強度となり小出血を認めた．一般に致死量群では急速に中毒死したためにその所見は強烈さに欠け，かえつて致死量よりやや少い群ではむしろ適当な日時を経たため中毒症状が鮮明に現われたといえる.

2. 慢性中毒と生体臓器親和性

ローダミン，スルフォローダミンの投与量は共に致死量（ラットLD$_{50}$ 0.246±0.114g/kg，スルフォローダミンM.L.D20g/kg）の1/10量，1/100量，1/1,000量，1/10,000量投与の4群と着色料を投与しない対照群とに分け，ラッツトにローダミン或はスルフォローダミンを長期にわたり連続投与すると，その投与量と投与日数に幾分比例してラットの生育の状態，生体臓器との親和性に差がみられた.

ラット生育の状態はローダミンではいずれの投与群も対照群とほぼ類似の体重増加率をなし全頭が生存した．スルフォローダミンでは致死量の1/10量投与群では対照群と較べると，若干発育の差がみられたが1/100量投与群以下の群ではいずれも健常な生育を示した．生体臓器との親和性は主に肝臓，脾臓，腎臓，腸，心臓及び肺臓などについて検索した．ローダミンを経口的に連続投与すると，かなり大量（致死量の1/10量）を投与しても生育には目立つた影響を与えなかつたが，生体臓器との親和性は鮮明に現われた．即ち1ヶ月投与した時の肝臓では致死量の1/10量投与により肝細胞の軽度の溷濁，グリソン氏鞘の円形細胞浸潤を認めるがそれが2～3ヶ月に及ぶと病変も一般に強度に現われ，脂肪変性，星細胞の腫脹，溷濁，鬱血なども中等度にみられるようになる．投与量が逓減するにつれて病変の発現は軽度となり，致死量の1/10,000量投与では軽度の鬱血を認める程度である．致死量の1/10量及び1/1,000量投与では1～3ヶ月ともほとんど類似の成績がみられ，連続投与による病変部の顕著な進展はなく，軽度の鬱血，脂肪変性，星細胞の色素沈着，及び所により核の変性をみるに止どまつた．腎臓では致死量の1/10,000量群以上では当初細尿管，上皮細胞に所々軽度の鬱血がみられたが，2～3ヶ月続けると1/1000量群以上では曲細尿管の溷濁腫脹が中等度にみられ，病変も幾分増悪した．肺臓では致死量の1/10量投与の場合に気管支周囲の浮腫及び出血を，心臓では致死量の1/100量以上投与のとき心筋繊維の硝子変性を認めたが，これら以下の投与量では3ヶ月連続投与しても著変は認めなかつた．スルフォローダミンでは大量（致死量1/10量）を連続投与するとついに生育に影響を与えたが，その1回投与量を減少させると一部の臓器を除き生体臓器に対する障害性は軽弱している．最も鮮明な変化のみられるのは肝臓で致死量の1/100量以上では，1ヶ月投与時の所見は肝細胞の中等度の空胞変性並に鬱血を認め，核は大小不同となりグリッソン氏鞘に中等度の細胞浸潤がみられたが，2～3ヶ月に至ると症状も一般に強度となり，巣状の空胞変性，内皮細胞の増殖，結節形成などが

みられる．1/1,000量では1～2ケ月間連続投与では何等の著変を認めなかつたが，3ケ月投与のときにのみ軽度の細胞浸潤を認めた．その他の臓器では致死量の1/10量を連続投与すると，投与日数が進むにつれて症状も悪化し，脾臓では軽度の鬱血，淋巴沪胞の消失が，肺臓では肺出血及び気管支周辺に淋巴沪胞が著明で，腎臓では鬱血を，心臓では軽度の硝子変性を認めるが，腸管には著変を認めない．致死量の1/100及至1/,1000量投与群では脾臓に軽度の鬱血，ヘマトポエーゼを認めたのみで，腎臓，心臓，肺臓，腸などには着変はない．致死量の1/10,000量投与群では3ケ月間投与のとき腎臓に軽度の鬱血を認めたが，その他の臓器では2～3ケ月に於ても何等の著変を認めなかつた．オーラミンの投与量は沢庵を基準にして1日成人の採食量を概算すると約0.6mg/kgと推定されたので，ラットに対してその100倍量（マウスLD_{50} 0.48±0.025/kgの1/8量），50倍量（1/16量），10倍量（1/80量），5倍量（1/160量），1日採食量（1/800量），1/5量（1/4.000量）及び1/10量（1/8,000量），それに対照群と計8群である．急性中毒量以下のオーラミンの所定量を，ラットに長期間連続投与すると，その投与日数と投与量に比例してラツトの生育の状態，生体，臓器との親和性に顕著な差が認められた．まず体重増加の状態をみると，1回の投与量が1の日採食量の50倍以上の大量になると，投与開始と同時に発育は幾分不良となり他の群に較べて体重の増加率は低い．この状態は1～3ケ月後に於ても観察されたが，投与中体重が減少することはなく全頭生存するのがみられた．投与量が1日採食量の10倍量以下の群では，対照群と較べると群別により若干の発育の差がみられたが，いずれも健常な生育を示した．生体臓器との親和性は主に肝臓，腎臓，心臓，肺臓について検索したが，投与量が1日採食量の100倍量のものでは，投与と共に発育不良を示しており生体臓器の変化も著明に現われ，1ケ月投与時の肝臓は肝細胞核の大小不同があり，所々巨大核を認める．核は一般に濃染し核膜不正形のものがみられる．

また二核性細胞が多い．原形質は一般に溷濁しグリソン氏鞘に細胞浸潤が稍強くみられた．それが2～3ケ月に及ぶと病変も一般的に強度に現われてくる．腎臓は1ケ月間連続投与では細尿管の溷濁腫脹と，僅かではあるが細尿管上皮に有糸核分裂をみるが，2～3ケ月になると壊死に陥つた，細尿管上皮及び新生したと思わる上皮所々に散在している．1日採食量の50倍量投与群では1ケ月連続投与したときの肝細胞はやはり核の変化に富んでおり膨大した核が比較的多く部分的に大小不同が強く濃縮性の核が散在した．これが2～3ケ月に至ると核の大小不同はより強くなり，多くはないが有糸核分裂を観察し得た．腎臓は皮質に所々小細胞浸潤巣を，又髄質の乳頭に移行する部分に可成り細胞浸潤を認める．又細尿管は稍溷濁腫脹し上皮細胞核に有糸核分裂を認めるものがある．3ケ月になると部分的に細尿管が壊死に陥り，又管腔内は円柱形成を認めるものもある．

1日採食量の10倍量投与群は肉眼的に余り顕著な変化を認めなかつたが病理組織学的には肝臓では細胞核の膨大しているのもみられ，腎臓では上皮細胞核に所々核分裂及び核の大小不同をみることが出来た．しかしその程度はいずれも軽症である．これに類似した成績が1日採食量の5倍量投与群に1例，腎臓に1個所可成り強い細胞浸潤をみたが，同群でも他のものでは3ケ月連続投与しても全く著変を認めない．そこで全頭が3ケ月間連続投与しても全く著変を認めなかつたのは1日採食量(致死量の1/800量)以下の群に限られていた．マラカイトグリ緑，ブリリアントミーリング緑の投与量は，致死量（マラカイト緑はラットのM.L.D.0.5g/kgブリリアントミーリング緑はMLD20g/kg)の1/10量，1/100量，1/1,000量，1/10,000量投与と着色料を投与しない投与群の計9群である．

マラカイト緑を連続投与したときのラット体重増加の状態は，1回の投与量が致死量の1/10量という比較的大量になると，投与開始後殆んど顕著な体重増加はみられなく，46日前後までに全頭斃死した．致死量の1/100量投与群では投与初期は他の群と同様の発育がみられたが，20日前後から徐々に体重は減少し他の群に較べると殆んど体重の増加はみられず，この状態は60日及至90日後に於ても観察された．投与量が1/1,000量以下の群では対照群に較べると若干の差はみられたが，特記すべき程度にはみられず健常な発育を示した．ブリリアントミーリング緑投与群では群別により発育に幾分の差異はみられるが，投与中に斃死するものは一例もなく全頭生存するのがみられた．

生体臓器親和性は主に肝臓，脾臓，腎臓，心臓，肺臓，膵臓，腸などについて検索したが急性中毒マウスの病理所見と同様に鮮明に病変がみられた．肝臓と腎臓とについてみると，マラカイト緑の1/10量投与群の斃死ラット及び30日目に撲殺したものも，その所見は類似し肝臓では肝細胞の脂肪変性が強く，核の淡染，濃縮などをみる．腎臓も実質変性を主変とし，特に上皮細胞に於て顕著である．投与中斃死したものでは細尿管上皮細胞の溷濁，核濃縮を認め，特に48日目に斃死したものでは上皮細胞の脂肪変性を認めた．致死量の1/100量投与群の病理所見は順調な発育を示して来た1ケ月目では特記すべき変化を認めないが，2ケ月目になると病変がみられる．即

ち肝臓では中等度の鬱血並びに脂肪変性を認め，所々原形質がエオヂンに濃染する部位が散見され，核も又幾分巨大となり，なかには核質崩壊像も僅かにみられる．この所見は3ヶ月目に於ても類似している．一方腎臓ではやはり投与1ヶ月目では何等の著変を認めないが，2～3ヶ月目になると細尿管上皮の軽度の溷濁及び脂肪変性を認めた．致死量の1/1,000量及び1/10,000量投与群では前群に較べると病理所見も弱く，1/1,000量投与群の肝臓は1～2ヶ月目では何変病変を認めないが，3ヶ月目に軽度の鬱血及び核の濃縮を認める程度に止り，腎臓も2ヶ月以後に処々に上皮細胞の溷濁，脂肪化を認めた．1/10,000量投与群では肝臓には殆んど変化を認めないが腎臓には2ヶ月以上連続投与すると上皮細胞の溷濁を認めた．

ブリリアントミーリング緑は中毒量附近では実質変性並に循環障害がみられるが，投与量がこれより減量すると急速に毒性の発現の度合は弱まり肝臓のみに変化が認められた．即ち1～2ヶ月連続投与により所々に軽度の脂肪化を認め，又極く軽度に核変性をみられた．この所見は3ヶ月投与時にも類似の成績がみられた．致死量の1/100量投与では投与日数には余り影響なく，1～3ヶ月投与により肝臓の所々に軽度の鬱血，溷濁を認めるに止つた．1/1,000量投与では1～2ヶ月では著変を認めないが，3ヶ月に至ると肝細胞の脂肪化及び核変性を認めたが，1/10,000量投与では3ヶ月間投与しても何等の著変を認めなかつた．従つて全頭が3ヶ月連続投与しても肉眼的にも病理学的にも全く著変を認めなかつたのは致死量の1/10,000量以下のときに限られた．

3. 総括及びむすび

食品着色料は第1条件として生体に無害なことが望まれるが，ローダミン，オーラミン，マラカイト緑などの毒性について詳細に吟味した報告に乏しいので，著者らは先ずマウスを用い急性中毒量を実測し致死因，障害機作について究明した．

急性中毒量は市販で最も繁用される赤色々素のローダミンが最も毒性は強く LD_{50} は，0.174± 0.0115g/kg で次が緑色々素の 0.2186±0.0223g/kg，黄色々素のオーラミンは三者中で最も少く，0.48±0.025g/kg と実測された．ローダミンにスルフォン基を導入したスルフォローダミンは M.L.D.は20g/kg と約 1/100 倍に逓減している．又ブリリアントミーリング緑は M.L.D.10g/kg で毒性は比較的軽微といえた．供試食用許可色素は大部分は毒性は 5g/kg 以上で軽微であるが，食用赤食3号は試料によつてはかなりその急性中毒量を異にし，実験に選んだ検体のうちには 0.255±0.0125g/kg を示し注目された．これは同一試験を繰返して確認する一方，F社製の最純品及びアメリカナショナルアニリン会社製のものについて検べたが，この結果も赤色々素のうちでは毒性は強い部類に属し，F社製のものは 1.26±0.1291g/kg ナショナルアニリン製のものは 2.35±0.1306g/kg と前述のものよりは幾分少いことが判つた．

急性中毒死したマウスの生体臓器との親和性はいずれも比較的類似し，実質変性と循環障害とを主変とし，肝臓，脾臓，肺臓，腎臓に著変を認める．法定外着色料と食用色素とは投与した時の侵襲部位は比較的類似しておりただ臓器との親和性に差異があるため，中毒量及至は致死量に差異がみられる．著者らはラットに所定量の着色料を連続経口投与して検べたところ，ラットの発育状態に及ぼす影響はマラカイト緑を除くローダミン，スルフォローダミン，オーラミン，ブリリアントミーリング緑では投与量の量的差異による影響は余りみられず，1回の投与量が大量のときも小量のときも体重発育曲線には有意の差はなかつた．マラカイト緑では致死量の1/100量以上では他の実験群，対照群に較べて発育は不良であるが，或は終には中毒死した．

これ以下の投与量では健康な発育を示し，特記すべき著変を認めなかつた．ローダミン投与群は投与日数により異るが肝臓では肝細胞の鬱血，脂肪変性，星細胞の腫脹，グリソン氏鞘の円形細胞浸潤を認め，腎臓では上皮細胞の変性を主変としている．岡本[2]もラットにローダミンを長期連続投与すると，肝臓と腎臓に主病変を認め，その所見は著者らの成績と大体一致し，肝臓では肝細胞壊死，充血，星細胞の腫大を認め，腎臓では糸毬体の充血，腫脹，細尿管上皮の変性を報告している．このローダミンは梅田[3]によると長期皮下投与により皮下肉腫を起すといつており，着色料と癌との関係は今後益々注目せられるところといえよう．スルフォローダミン投与群も主変臓器はやはり肝臓で肝細胞の空胞変性，鬱血，核変性などを認め，腎臓及び脾臓では鬱血がみられる．いずれにしてもスルフォローダミンは急性中毒量のときにみられた如くローダミンよりも毒性は軽度で臓器障害の割合は弱いと概括[4]された，市販菓子中のローダミン含量について検べたときの成績をみると金花糖では 43.7γ/g，ラムネ糖では29.1γ/g，玉飴では21.5γ/gで，大体40γ/g前後である．これは先きの動物実験で 90 日間投与後における病変の甚だ軽微であつた，致死量の 1/10000 量投与群を基準として換算するとローダミンは 17mg/g，スル

フォローダミン2mg/gとなる．この値は5～6才の幼児（15～17kg）が，金花糖を1日に7～8個程度を食べたときの近似量に相当するので，ローダミン使用の危険性を強く指摘することが出来る．これに対してスルフォローダミンの換算量は2mgであるので中毒量との間に約100倍のひらきがあることになる．オーラミンを使用した食品を長期間にわたつて飲食したときの毒性についてであるが，この点を嗜好品として賞用される沢庵を中心にて考察した．その投与量は成人(50kg)1日の沢庵採食量を175gと仮定して，これに含有するオーラミン量を基準しとし，これよりも多いか或は少い量を長期にわたり投与すると，その投与量にほぼ平行して慢性中毒所見が主に肝臓及び腎臓の実質細胞に認められ，肝臓では主に細胞核の変化が著明で，核の大小不同，二核性細胞或は巨大核などが多数現われMutagenとしての作用が強い，オーラミンが発癌物質となる可能性があると考えられるのもこの点に基因するのであろう．腎臓では上皮の変化が主変で，腎皮質の細胞浸潤，混濁腫脹及び上皮核の有糸核分裂などが観察される．1日採食量の50倍量以上の投与群では肉眼的病理組織学的に異常を認め，1日採食量の10倍量投与群は肉眼的には余り著変を認めないが，病理組織学的には肝臓及び腎臓に病変を認める．3カ月連続投与後全頭に全く著変を認めない限界は1日採食量投与群（致死量の1/800量）以下となる．

岡本[2]もラットにオーラミンを長期投与すると病変主徴は肝臓，腎臓に認め，肝細胞核の異大二核性細胞の増加を認めており，腎臓も上皮変性が生ずることを述べている．しかしCarcinogenとしての所見は未だ証明されていない．Yao (1937) はSurvey of Compounds which have been tested for carcinogenic activityのなかにラットを用い食物中にオーラミンをまぜて100日間与えたがオーラミンは発癌性はないと結論しており注目される．マラカイト緑ではこれを長期連続投与した場合，主に腎臓についで肝臓に病変を認める．一方ブリリアントミーリング緑はマラカイト緑に較べると，急性中毒の場合と同様慢性中毒症の発現は遅くまた弱い．即ち致死量の1/10量という大量投与でも，投与2カ月頃までは発育は正常で臓器に対する障害は認めない．しかしそのまま投与を続けると肝臓に軽度の脂肪化を認めた．1/100～1/1,000量投与群では肝臓に軽度の病変を認めるものもあつたが1/10,000量投与群では3カ月連続投与しても何等の著変もみられない．ブリリアントミーリング緑は主に肝臓に限局して投与量，投与日数に左右されながら軽度の障害がみられた．

結局マラカイト緑とブリリアントミーリング緑とはそれらの投与による発現の部位は類似しているが，投与量による傷害状態は異り，同一投与量で比較すると後者は前者より毒性は著しく軽微であるといえた．

先きに著者らが昆布或は若芽中のマラカイト緑の含量を実測したときの成績と比較して考察すると，昆布では0.313mg/g，若芽では0.05mg/gと計測されたが，これは動物実験で90日間投与後における病変の甚だ軽微であつた致死量の1/10,000量投与群を基準として換算すると，マラカイト緑には50mg/kg，ブリリアントミーリング緑では2mg/kgとなる．この値は成人（50kg）が1日に昆布を約8g前後を食べたときの量に近似するのでマラカイト緑は相当に有害であることが窺われる．而しブリリアントミーリング緑では換算量は2mg/kgであるので，マラカイト緑の40倍量を連続投与しても生体には障害を与えないといえた．

終りに臨み病理所見について御高覧御教示下された順天堂大学伴教授，横浜医科大学大久保教授および丘博士に感謝します．

また貴重な試薬を御分与下された保土谷化学工業K. K.，住友化学工業K. K.の研究部の方々に御礼申上げます．

文　　献

1）青山，宮沢，八田，小田，浦部，酒井，藤田：衛試75．159（1957）．

2）岡本，古河，川路：日本病理学会会誌，27，11（1939）．

3）梅田：第13回日本癌学会口演（1954）．

4）八田，青山，宮沢，大竹，小田：公衆衛生，16(4)，37（1954）．

Summary

The tonic natures of the food dyes (Rhodamine, Auramine and Malachite green etc,) were tested to mice and rat whose acute lathal doses and chronic toxic doses were measured.

The results that examined histopathologicaly on their cause of death and it mechanisms were described.

Received June 18, 1957.

食品着色料の食品衛生学的研究（第3報）特にオーラミン，マラカイト緑の血液及び肝臓機能に及ぼす影響

青山好作，　宮沢文雄，　栗栖弘光，　八田貞義*，
川浪　昇*，　浦部幹雄*，　酒井雄学*，　藤田昭丸*

Hygienic Studies on Food Dyes. Ⅲ.

Kosaku AOYAMA,　Fumio MIYAZAWA,　Hiromitu KURISU,
Sadayoshi HATTA,　Noboru KAWANAMI,　Mikio URABE,
Yugaku SAKAI and Akimaru FUJITA

まえがき　食品着色料を長期にわたり連続投与したときの慢性中毒症の発現の度合は，ラットを基として多角的に究明し，実質臓器に対し中毒病変を発現させる量的な条件，組織障害所見などについて明らかにし得たが，着色料投与中に生体諸機能が微細に反応し，一過性に終始している事実があるか否か，これらの諸点を解明する目的で，ウサギを供試動物に選び，オーラミンおよびマラカイト緑の，血液および肝機能に対する影響並びに臓器親和性について検討を加えたので，以下この成績について報告する．

Ⅰ. 実 験 方 法

実験にはウサギ（白色の雄のみ）を用い飼育並びに観察の要領は先きの慢性中毒症を吟味したときのラットと同じ条件で行い判定した．特にウサギの生活変化に留意し，このため隔日毎に体重を測定し，採食並びに排泄状態を検べた．投与量はオーラミンでは沢庵1日採食量の400倍量（致死量の約1/2量），160倍量（致死量の1/5量）80倍量（致死量の1/10量）の大量投与群と沢庵1日採食量（致死量の1/800量），及び1日採食量の1/2量（致死量の1/1600量）の常用量とに大別し，またマラカイト緑では致死量の1/5量および1/100量を，ブリリアントミーリング緑では，致死量の1/100量および1/1,000量とに大別し，いずれの場合も連続30日間投与し，この間一定日数毎に検査した．なお着色料は蒸留水に浮游させてウサギに経口的に投与させるので，対照としてウサギに蒸留水を1.5cc/kg宛同様術式で投与し参考とした．検査のうち血液検査は，赤血球，白血球数はThoma-Zeiss式メランジュールを用い，Thoma血球計算板で測定し，血色素はSahli法により．血液像は血液塗抹標本のGiemsa染色又はMay-Giemsa染色法で，赤血球沈降反応はWesteagren法により1時間，2時間，24時間の3回測定した．血清総蛋白量は日立蛋白計により測定した．肝臓機能検査は，色素負荷排泄試験として，Hepatosulphalein 排泄試験[1-2]を行い，その他尿中ウロビリン及びウロビリノーゲン[3-4]について定性試験を行つた．更にズルホサリチル酸法により尿蛋白を検べ，定量は，Hagedorn-Jensen 法により，黄疸出現の場合には血中のBilirubin定量はMeulengracht比色定量法（Meulengracht法と略す）により，又黄疸の種類の判別には必要に応じてHijman Van der Bergh反応（Hijman V. D. Berghと略す）をも実施した．その検体の採取時期及び間隔は各表に詳記した．

Ⅱ. 実 験 成 績

1. オ ー ラ ミ ン

i 血液に及ぼす影響　オーラミンをウサギに長期にわたり連続投与しながら赤血球数，血色素，白血球数，血液像，赤血球沈降速度及び血清蛋白量などの量的，質的な変化について詳細に検討したが，0.24g（致死量の1/2量）投与のウサギ（投与後1匹は5日目，1匹は9日目に斃死）でも生体血液に軽度の白血球増加（中性白血球）がみられるのを除いては，特記すべき著変は認めなかつた．したがつてオーラミンは血中にかなりの高濃度に保持されても血球数の動揺或いは血液像及び血清蛋白量などの量的，質的に大なる変化はみられず，造血機能に対しては余り認むべき影響は与えないようである（第1～2表参照）．

* 日本医科大学衛生学教室

第1表　オーラミン(致死量1/2量)連続投与時の血液肝臓機能及び尿所見

検査月日		投与前	投与8日目
体重 (kg)		2.34	2.02
血液	赤血球数	470×10⁴	360×10⁴
	血色素(ザーリ%)	70	65
	白血球数	6,700	7,800
	血液像　塩基	0	0
	血液像　酸	1.0	0
	血液像　偽酸	36.5	72.5
	血液像　淋巴	58.0	26.0
	血液像　単核	4.5	1.5
	血液像　その他	0	0
	血沈	1　2　24 4　10　78	1　2　24 1　2　90
	血清蛋白量	6.0	5.6
肝臓機能	ヘパトサルファレイン	<50%	40%
	H. V. D. Bergh反応		遅延反応
	黄疸指数(モイレングラハット氏比色定量法)		
尿	ウロビリン	−	卌
	ウロビリノーゲン	−	卌
	蛋白(スルフォサリチル酸法)	−	＋
	糖(ニーランデル反応)	−	−

註 (1) 表中(−)は反応陰性，(＋)(廾)(卌)は反応陽性で，且つ強度を示す．

(2) H. V. D. BerghはHijmans Van der Bergh反応の略．以下の表もこれに準ず．

第3表　オーラミン（致死量の1/10量）連続投与時の血液，肝臓機能及び尿所見

検査月日		投与前	投与3日目	6日目	9日目	12日目	15日目	18日目
体重 (gk)		2.07	2.02	2.00	2.10	2.02	2.08	2.10
血液	赤血球数	439×10⁴	435×10⁴	495×10⁴	499×10⁴	449×10⁴	484×10⁴	488×10⁴
	血色素(ザーリ%)	73	72	78	78	73	75	73
	白血球数	10,222	10,000	10,400	10,500	10,300	10,400	11,100
	血液像　塩基	0	0	0.5	0	0	0	0
	血液像　酸	2.5	1.5	1.0	0.5	3.0	1.5	0
	血液像　偽酸	68.0	56.0	58.5	62.5	55.0	40.5	39.5
	血液像　淋巴	26.0	37.0	35.5	32.0	38.0	50.0	58.0
	血液像　単核	3.5	5.5	4.5	5.0	3.5	2.0	2.5
	血液像　その他							
	血沈	1(時)2　24 1　5　80	1　2　24 1　3　72	1　2　24	1　2　24 1　5	1　2　24 1　3　62	1　2　24 1　3.5	1　2　24 2　6　78
	血清蛋白量	6	5.9	5.8	6.5		6.5	6.2
肝臓機能	ヘパトサルファレイン	<5%	<5%	5%	<5%	<5%	−	<5%
	H. V. D. Bergh反応							
	黄疸指数(モイレングラハット氏比色定量法)							
尿	ウロビリン	−	−	＋	＋	＋	＋	＋
	ウロビリノーゲン	−	−	−	＋	廾	＋	廾
	蛋白(スルフォサリチル酸法)	−	−	±	＋	−	−	＋
	糖(ニーランデル反応)	−	−	−	−	−	−	−

検査月日		21日目	24日目	27日目	30日目	33日目	36日目	39日目
体重(kg)		2.14	2.04	2.07	2.00	2.05	2.06	2.02
血液	赤血球数	447×10⁴	481×10⁴	430×10⁴	442×10⁴	430×10⁴	510×10⁴	454×10⁴
	血色素(ザーリ%)	73	72	73	76	76	77	73
	白血球数	10,400	10,400	9,400	9,400	10,200	9,800	9,800
	血液像 塩基	0	0	0	0	0	0.5	1.0
	血液像 酸	0.5	0	2.5	1.0	1.5	1.0	0
	血液像 偽酸	44.5	55.5	40.0	31.5	44.0	47.5	47.0
	血液像 淋巴	50.0	38.5	51.5	65.0	52.0	48.5	50.0
	血液像 単核	4.0	6.0	4.0	2.5	2.5	2.5	2.0
	血液像 その他						2 24	
	血沈	1 2 24 1 3 62	1 2 24 1 3 35	1 2 24 1 4 53	1 2 24 1 3 48	1 2 24 1 3 64	1	1 2 24 5 12 84
	血清蛋白量	6.0	5.8	6.3	5.4	5.2		
肝臓機能	ヘパトサルファレイン	<5%	<5%	<5%	<5%	<5%		<5%
	H. V. D. Bergh反応							
	黄疸指数（モレイングラハット氏比色定量法）							
尿	ウロビリン	±	+	+	−	−	−	+
	ウロビリノーゲン蛋白	±	++	+	±	±	−	+++
	蛋白（スルフオサリチル酸法）	−	±	−	−	−	−	+++
	糖（ニーランデル反応）	−	−	−	−	−	−	−

ii　肝臓機能に及ぼす影響　オーラミンを長期にわたり連続投与すると，その投与量に或る程度比例して肝臓機能障害が認められる，そこでこの障害の種類，及び程度，その予後などを知るために，主に肝臓の分泌及び排泄機能と解毒機能との二面から検索したが，このときの成績を色素の投与量とそのときの生育状態などを照らし合せながら吟味すると，0.24g/kg量（致死量の1/2量）連続投与のものでは1匹は投与5日目（Aと仮称す）に1匹は9日目（Bと仮称す）に中毒死した．これらの例では投与経過にしたがつて肝機能障害が明瞭に観察される．ず Hepatosulphalein 排泄試験でこの間の様子を探ると，普通は試薬注入後色素は，Kupper 細胞によつて捉えらまれ，ついで肝細胞により胆汁中に排泄され，30分後では色素含量5%以下，45分後では0%となるものが，Aは投与5日間で測定値は50～60%を示し，Bは投与開始後8日目に検査したところ40%と実測され，両者共に尿中ウロビリン，ウロビリノーゲンも検知された，このウロビリンノーゲン尿が検知されることは，大循環系を経て腎臓から排泄されるウロビリノーゲンが，肝障害のため処理が不充分となり尿中への排泄が増量したもので，肝臓実質の機能障害または変性が考えられる（オーラミンは血液には影響を及ぼさないので血球を破壊したとき生ずる現象とは異ると考えられる）．またHijman V. D. Bergh 反応は遅延直接反応型でMeulengracht法によると，Aでは黄疸指数は40を示し，中等度に黄疸を認めた．Nylander 法により尿中に糖が存在するかどうかを検べたが，試験結果は陰性であつた．これはBでも全く同様な成績で，オーラミンを連続投与して行くと肝実質障害が現われ，終には肝細胞性黄疸が発現した．以上の症例のようにオーラミンは，それを連続投与すると肝実質変性を起し，このため黄疸を併発した．

このようになつたとき直ちに投与を中止して，予後推移状況の観察をとげた．すなわち0.24g/kg量を4日間連続投与して，型の如く肝細胞性黄疸を起させ，このときの諸種の試験成績は，Hepatosulphalein 排泄試験は40%，Hijman V. D. Bergh 反応は遅延直接反応陽性，Meulengracht 法による黄疸指数33，尿ウロビリン，ウロビリノーゲン及び蛋白は陽性である．そこでオーラミン投与を中止して，中止後は3日間隔で3回検べたが，Hepatosulphalein 排泄試験は投与中止3日後ですでに40%のものが，7～8%と減少し，尿蛋白は反応陰性，Meulengracht 法による黄疸指数も35が10と減少している．これが中止後6日目以後になるとHepatosulphalein 排泄試験は5%以下となり，黄疸が消失したと思われるときも，陽性を示した尿ウロビリン，ウロビリノーゲンはもはや検知し得なくなつており，潜在性肝障害の存在を窺知するのが困難であつた．結局オーラミンによつて惹起された肝障害はオーラミンを中止することによつて比較的急速に回復が営まれることが想像された．

そこで次に1回の投与量を0.1g/kg量（致死量の1/5量）とすると，肝機能障害の現われ方も著しく軽度となり，もはや投与により中毒死はみられない．すなわち3日間隔に12回（36日間）実測したところ，投与後10～12日頃

から尿中ウロビリン，ウロビリノーゲンは反応陽性となり潜在性肝障害の発現が認知された．この肝実質障害の発現度合はウサギによつて必ずしも等しくはないが先の0.24g/kg量投与群よりも軽度に現われている．これを尿ウロビリノーゲン反応及びHepatosulphalein排泄試験の成績で較べてみると，投与10日頃から尿中ウロビリノーゲンは検出され肝障害が窺知され15日目頃までは特に悪化の傾向を示さなかつたが20日頃急に悪化し，Hepatosulphalein排泄試験の値も15〜20%にみられ，血清の色も黄疸色を呈し，Meulengrucht法による黄疸指数は8を示した．

しかしこれは1週間後には排泄値は5%以下と軽快し，時に尿ウロビリノーゲン反応が陰性となる程度にまでは恢復してきたが，0.1g/kg量では投与継続するときは肝障害は全く回復せず，潜在的に実在した．しかしこれもその投与量を0.05g/kg（致死量の約1/19量）にすると，肝障害も極く軽症となり，もはやHepatosulphalein排泄試験では感知されなくなり，僅かに尿中ウロビリン及びウロビリノーゲン反応によつて検知されるに止まつている．これも投与量が0.6mg/kg量（致死量の約1/800量沢庵1日採食量）になると43日間連続投与しても試みたすべての試験は陰性成績を示し，生体には特記すべき顕著な障害を与えないようである．以上オーラミンを投与したときにみられる肝障害を肝臓の分泌及び排泄機能に対する影響を中心に検討したが，このような状態のとき肝臓の解毒機能も，また障害されているかどうかサントニン酸ソーダ負荷試験[5-6]を施して検べてみた．オーラミン0.16g/kg量（致死量の1/3量）を5日間連続投与して肝障害をおこさせ，5日目にサントニン酸ソーダ法によつて，尿中赤色物質（β-oxy-santonin）の排泄量をオーラミンを投与しないときの排泄量と較べてみた．この試験においては色素が肝臓において生成される事実に基いて解毒機能検査として応用されるのであるが，大体4時間前後で排泄の大部分は2〜3時間迄になされ，排泄量の最大に達する時間は1〜2時間目であつた．この総排泄量は，1例は1.30，1例は1.11であつた．一方オーラミンを投与したときは，排泄量の最大に達する時間等はオーラミン非投与とほとんど変りないが，赤色物質排泄持続時間が幾分遅延し，その排泄量が著しく減少しており，1例は0.67，1例は0.86となつた．このことはオーラミンを大量に連続投与し肝臓障害を起した場合，排泄機能障害のみでなく解毒機能も幾分障害されることを知つた（第3表参照）．

第3表　サントニン酸ソーダ負荷試験における尿中赤色物質

動物番号	検査時間（時）／区分	1	2	3	4	5	計
No. 5	投与前	0.9	0.28	0.04	0.05	0.033	1.30
	投与5日後	0.2	0.26	0.11	0.1	0.011	0.67
No. 6	投与前	0.28	0.73	0.025	0.025	—	1.110
	投与5日後	0.48	0.11	0.07	0.1	0.1	0.86

註 (1) 5%サントニン酸ソーダ液（サントゾール）1.0cc耳静脈に注射．
(2) 比色標準液にはアゾルビンS溶液を用いた．
(3) 赤色物質の計算は次式によつた．

$$\frac{\text{測定時（稀釈液）のアルカリ性被検液量×被検液総量}}{\text{測定に用いし被検液量×検定標準液の倍数}}\times 100=\text{被検液総量中の紅色表量.}$$

次にオーラミンを与えたときのウサギの血糖に及ぼす影響[7-8]をHagedorn法によつて検べた．オーラミンの投与量は0.16g/kg（致死量の1/3量）とし，血糖値の測定は投与前1回と投与中4回（4日間）及び投与中止後5回（5日間）の計10回行つた．血液採取の時期は朝の飼料を動物に与える前に行つた．オーラミンを投与すると，投与3日目に尿蛋白が検知され，4日目に尿ウロビリノーゲンが認められた．このことは潜在性の機能障害を発現させるが，投与を中止させると比較的速かに尿ウロビリノーゲンは消失した．このような状態のとき及びその前後の血糖値についてみると，オーラミン投与前血糖値が，84mg，91mgのものが，オーラミンを投与するとはじめの時期において軽度に血糖値の降下が認められ，その値は1日目が62mg，71mg，2日目は40mg，67mgと1度減じた3日目頃から幾分増加したが投与中はやはり血糖値は降下の傾向を示し，オーラミン投与中止後はじめて再び旧に復した（第4表参照）．

第4表　オーラミン投与中の血糖値

区分 \ 検査時間(S)		投与前	1	2	3	4	5	6	7	8	9
血糖量	No. 5	84	62	40	67	76	84	98	84	84	84
	〃 6	91	71	67	82	80	84	80	80	84	84
尿蛋白（スルフォサリチル酸法）	〃 5	−	−	−	±	卅	+	−	+	−	−
	〃 6	−	−	−	±	卅	+	−	−	−	−
尿ウロビリノーゲン	〃 5	−	−	−	−	卅	±	−	−	−	−
	〃 6	−	−	−	−	卅	±	−	−	−	−
尿糖（ニーランデル反応）	〃 5	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	〃 6	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−

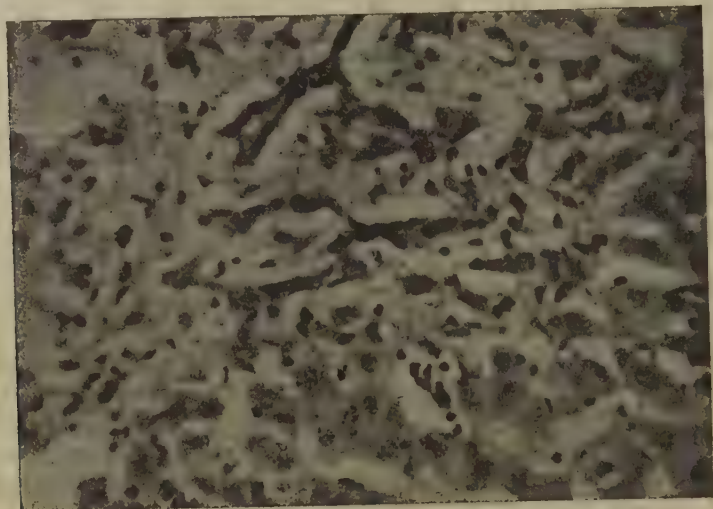
註：1）表中数値の単位はmgとす．
2）表中記号の（±）は反応疑陽性，（+）（卅）は反応陽性の程度を示し（−）は反応陰性とす．

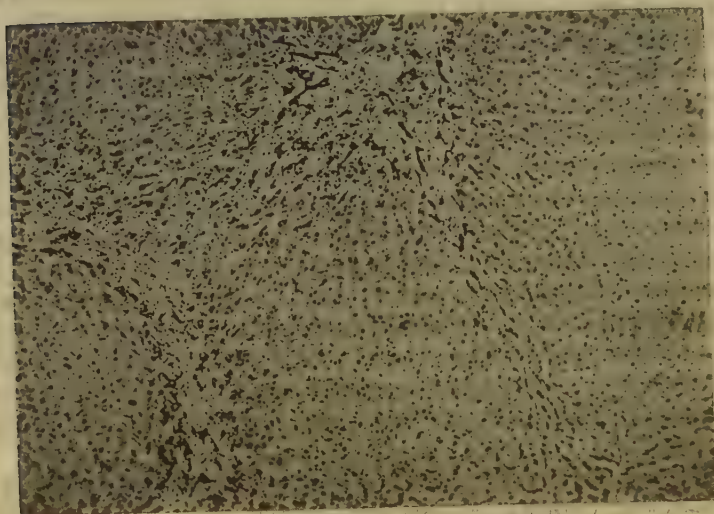
iii　生体臓器親和性　一定量以上のオーラミンを長期にわたり連続投与すると，重点的に肝機能障害が認められ，その時の投与量が比較的少いものでは障害は一過性に現われ，投与中でも検査成績は陽性のものが再び陰性となつた．しかし投与量が比較的大量のときでは，投与を中止した時に始めて陰性となり，投与をつづけると往々に重篤な症状を示し終には中毒死した．まず大量のときの成績からみるとウサギに2g/kg量を投与し翌日斃死した急性中毒の所見は肝細胞が瀰漫性につよい壊死と変性に陥り，正常組織は僅かにグリソン氏鞘周囲にのこつているにすぎず，ところどころに出血がみられ，強拡大でみると肝細胞の瀰漫性の強い壊死があり軽度の脂肪変性がある核の崩壊があり，少数の白血球の出現がある．

グリソン氏鞘に軽度の円形細胞浸潤がみられ，また結晶体の析出がみられるところもあり恰も急性黄色肝萎縮様の所見である（写真1参照）．つぎに0.24g/kg量（致死量の1/2量，沢庵1日採食量の400倍量）を連続投与したウサギは投与7日目頃から衰弱が甚しくなり9日目では瀕死の状態となつた．当日撲殺解剖後必要な処置を施して病理組織学的に究明したところ，主変臓器はやはり肝臓と腎臓で，肝臓ではグリソン氏鞘の結締織の増加が著名で胆管の上皮増殖偽胆道の形成がみられ，肝細胞もまた肥大増殖するのが認められた．腎臓では細尿管主部上皮細胞の溷濁腫脹，移行部上皮の脂肪変性がみられた．心臓も心筋繊維の脂肪変性を認めた．そこで同じ量を連続的に投与しながら機能検査（Hepatosulph alein排泄試験，尿ウロビリン体，ウロビリン及びウロビリノーゲン反応，Hagedorn法など）を試みこの反応が陽性となつたときに投与を中止して，以後は単に飼育のみをつづけ，この間生体の回復状態を3日おきに3回にわたつて検査し考察を加えた．更に3回目の試験終了後には撲殺して病理組織学的に究明した．この結果投与中止後の機能検査では，いずれの検査成績も陰性で，全く正常と解されたが，病理組織学的には，病変が観察され機能検査的には回復しても病理組織学的には完全に回復していないことを知つた．その所見についてみると，肝臓では軽度の鬱血を認め，中心帯及び中間帯の脂肪変性及び空胞変性がみられる．しかし肝細胞の壊死はみられない．なおグリソン氏鞘の結締織増殖と偽胆道の形成がみられた．腎臓では糸毬体には変化はないが，細尿管主部上皮では脂肪変性が集合上皮では強い透明化が観察された．このほか脾臓と心臓にも認められ，脾臓では淋巴沪胞及び胚中心の増殖，脾竇の拡張が認められ，心臓では軽度の心筋の脂肪変性がみられた．

次に投与量が0.1g/kg量（致死量の1/5量1日採食量の160倍量）になると病理所見は幾分軽度となり心臓では著変を認めない．しかし肝臓では肝細胞は一般に萎縮し核は少しく肥大，中心帯，中間帯には瀰漫性脂肪変性を認める．またグリソン氏鞘周辺に著明な偽胆管の増殖と結締織増加がみられ軽度に円形細胞の浸潤がみられた．（写真2参照）．腎臓では処々に小円形細胞の浸潤を認め，脾臓では淋巴沪胞増殖し脾竇やや拡張している．心臓では著変を認めない．その1回の投与量が0.6g/kg量（致死量の約1/800量沢庵1日採食量）とした場合は60日間連続投与しても腎臓，心臓，脾臓などの主要臓器に著変なく，ただ肝臓のグリソン氏鞘周囲の細胞に核肥大が僅かにみられる程度に止つており，対照としてオーラミンを投与しないで，蒸留水1cc/kg量を与えたウサギについて観察を試みたが，60日間連続投与しても病理組織的には特に顕著な所見は認めなかつた．したがつて供試動物にウ

サギを選んだ場合も，ラットの場合と同様沢庵1日採食量（致死量の約1/800量）以下の量では60日間連続投与しても肉眼的及び病理組織学的に著変を認めないといえる．

1. ウサギ肝臓（オーラミン0.1g/kg 投与，6週間目）

グ・氏鞘における結合織の増殖と偽胆管の増殖及び少数の円形細胞浸潤

2. ウサギ肝臓（オーラミン2g/kg 投与，6週間目）

肝細胞の強い変性壊死

1. マラカイト緑およびブリリアントミーリング緑

i 血液及び肝臓機能に及ぼす影響　ウサギにマラカイト緑を連続投与すると1回の投与量が致死量の1/5量では，投与7日目に斃死したが，致死量の1/100量では30日間投与するも肉眼的には何等著変を認めなかつた．この間投与を続けながら赤血球数，白血球数，血色素，血液像，血清蛋白量などの量的，質的な変化について，詳細に検討したが，血中にかなりの高濃度に保持されても大きな変化はみられず造血機能に対しては余り認むべき影響

を与えない．肝機能障害を潜在性肝障害の発見にすぐれているというHepatosulphalein 排泄試験で検索したが，試薬注入 30 分後では色素含量は 5 %以下で尿中ウロビリン，ウロビリノーゲン及び蛋白は陰性で検知されず，試みたすべての試験は陰性成績を示し，特記すべき障害を認めなかつた．

次にブリリアントミーリング緑について試みたが致死量の1/100量，および1/1000量を30日間投与したが，発育状態には影響なく，また試みたすべての試験も陰性で試剤を連続投与しても生体には特記すべき顕著な障害を与えないようである．同様の方法で対照として蒸留水を連続投与したが，投与方法による影響は認めなかつた．

ii　生体臓器親和性　マラカイト緑では致死量1/5量投与群および1/100量投与群共に肝臓障害が認められ，その所見についてみると，処々に肝細胞の融解像並びに核崩壊，核濃縮などの核変性および軽度の脂肪化を認めた．脾臓ではヘモジデローシスがみられたが，腎臓では致死量1/5量投与群に細尿管上皮細胞の軽い溷濁，曲細尿管，ヘンレー氏係蹄部の一部に崩壊像を認めた．

一方ブリリアントミーリング緑投与群も，致死量 1/1000 量投与群では病理組織学的に特記すべき著変を認めなかつたが1/100量投与群では，肝臓では軽度の脂肪変性および核変性を，腎臓では細尿管上皮細胞に軽度の溷濁腫脹を認めた．対照として着色料を投与しないで，蒸留水 1.5cc/kg 量を与えたウサギについて観察したが，30日間連続投与しても特に顕著な所見は認めなかつた．

総括及びむすび

先きの慢性中毒実験で最も鋭敏に障害がみられたのは肝臓といえるが，着色料を投与中，更に微細な障害作用があらわれるかどうか，ウサギを用いて血液及び肝臓機能に対する影響について検べた．肝臓の色素排泄が主として単なる物理化学的要約によつて支配されるか，或いは肝臓内特殊細胞の分泌機能に帰すべきか古くから論議されているが，肝臓中で色素を最も多く摂取するものは星芒細胞で肝実質細胞並びに胆管上皮細胞には色素顆粒が認められず，色素は血清より直接に胆汁に移行し，色素排泄に最も重要なる意義を有するのは恐らく門脈毛細管の内皮細胞である星芒細胞にして肝細胞分泌作用は余り関与しないといわれる．

しかし多田[9]は墨汁を大量注入し肝臓の星芒細胞に多量の炭末を喰食させて，或る者は全く機能的飽和状態にあるようにしても，肝臓の色素排泄力には少しの影響も認められないので，星芒細胞のみが色素排泄に関与するとは思われず，恐らく肝実質細胞の分泌機能も関与するのであろうと結んでいる．矢野[10]は冷血動物（カヘル）と温血動物（ニワトリ）の肝臓および腎臓の色素排泄機能について論及し，「ニワトリ」では肝臓の色素排泄機能は腎臓に比較して一般に著しく旺盛で，殊に拡散度低き色素は一般に腎臓より排泄されることが困難であるが「カヘル」では「ニワトリ」と逆で肝臓の色素排泄機能はむしろ腎臓よりも劣るという，更に矢野[11]は草食動物（ウサギ．ヤギ）と肉食動物（イヌ，ネコ）における肝臓及び腎臓の色素排泄機能について実験的に究明し，ウサギとヤギとはほぼ一致し，肝臓と腎臓とは，その排泄状態はほぼ平行していると云い，イヌ及びネコにありては，肝臓の色素排泄機能は強大で遙かに腎臓を凌駕し，殊に拡散度小なる色素に対する肝臓の排泄能力は旺盛であるという．この胆汁[12-15]も迷走神経を刺戟すると胆汁分泌は促進され，交感神経を刺戟すると分泌は抑制されることが明らかにされている．

オーラミンは一定量続けて投与すると，生体臓器と親和して病変が認められるが，このような時も造血機能に対して，認むべき影響を与えないので，血球数，血液像，血液沈降速度，血清蛋白量などは変化なく，諸家の成績に示された正常値の範囲内に保持された．ところが肝臓は腎臓と共に，著変臓器であるが，この機能に対する障害についてみると大量（致死量の1/3量）をつづけて与えると極く短日間（5～9日）で斃死し，斃死直前では，高度の肝臓機能障害を認め，肝実質性黄疸が現われた．そこで直ちに投与を中絶して観察すると，比較的急速に機能検査の結果は陰性成績を示し回復が想像されたが，病理組織学的には病変を認めた．この障害の度合はその一回の投与量を減らせば軽減し，特に沢庵 1 日採食量では 43 日間つづけても，すべての機能試験は陰性で病理学的には著変を認めない．またオーラミン投与により機能障害を起したものは，また解毒機能も幾分障害され血糖値も，やや降下の傾向も窺われた．この肝障害と共に糖化すべきグリコーゲンの減少により血糖値の低下することを，近藤[16]もウサギに黄燐を与え燐中毒を起させた時に認められると報告している．結局ウサギおよびラットについての試験成績では沢庵に含有されている程度のオーラミン含量では特記すべき機能障害は認めないのではないかと思われた．

マラカイト緑或はブリリアントミーリング緑では，血中にかなり高濃度に保持されても，血球数，血液像および血清蛋白量などには量的，質的な変化は与えず，造血機能に対しては認むべき障害作用がないといえる．また肝機能に対しても試みた全ての試験は陰性成績を示し，特記すべき障害を認めなかつた．ところがこれを撲殺して病理組織学的に究明したところ病変が観察され，特に肝臓と腎臓に軽度の実質変性を認めた．したがつて病理組織学的に軽度の変性を認めても生化学的試験では陰性成績を示していた．

文　　献

1) Rosenthal, S. M., & White, E. C., : *J. A. M. A.*, 84, 1112 (1925).
2) Osgoad, E. E., : *J. A. M. A.*, 134, 585 (1947).
3) 行徳：日本消化器学会誌，31，294 (1937).
4) Watso. C. J., Schwartz. D., Sboro, V. V., & Bertie, E., : A. *J. Clin. path.*, 14. 605 (1944).
5) 小田中：日医大誌，19，55 (1952).
6) 杉山：最新医学，7，83 (1951).
7) 桜井：北越医学会誌，42，1 (1926).
8) 新見：実験医学誌，12 (12)，1027 (1930).
9) 多田：実験消化器病学雑誌，1，11 (1915).
10) 矢野：実験消化器病学雑誌，1，416 (1915).
11) 矢野：実験消化器病学雑誌，1，416 (1915).
12) 成山：実験消化器病学雑誌，12，303 (1927).
13) 成山：実験消化器病学雑誌，12，316 (1927).
14) 成山：実験消化器病学雑誌，12，337 (1927).
15) 成山：実験消化器病学雑誌，12，348 (1927).
16) 近藤：日本薬物学誌，5，393 (1929).

Summary

It was examined in pararell that how blood and liver functions were influenced by food dyes (Auramine and Malachite green), when they were administered for long time and in series.

Received June 18, 1957.

食品着色料の食品衛生学的研究（第4報）

特にローダミン，スルフォローダミンの吸収並びに排泄について

青山好作，宮沢文雄，八田貞義*，小田幸子*，浦部幹雄*
酒井雄学*，藤田昭丸*

Hygienic Studies on Food Dyes. IV.

Kosaku AOYAMA, Fumio MIYAZAWA, Sadayoshi HATTA, Satiko ODA,
Mikio URABE, Yugaku SAKAI and Akimaru FUJITA

まえがき　食用許可色素および許可外色素について食品衛生学的に検討を進め，その急，慢性中毒の発現部位および蓄積による障害度などについて明らかにする事が出来たが，更に着色料を経口或は脈管内投与したときの吸収，排泄状態について追求してみた，又着色料の吸収に際し特に重視されると思われる拡散性についても検べた．

1．ローダミンおよびスルフォローダミンの血中濃度および尿中排泄量

市販飲食品より最も高率に検出される許可外着色料はローダミンで，その毒性は同じ様に多数検出され，繁用され易い傾向にあるオーラミン，マラカイト緑などと較べて最も高く[1] これによる中毒例[2] も報告されている．

そこで供試着色料として塩基性色素であるこのローダミンを，又これに対比する酸性色素としてスルフォローダミンを選んだ．

実験方法

着色料を生体内投与したときの血中濃度および尿中あるいは糞便中排泄量の問題は臓器内蓄積の問題と関連するところが多いので，この点を吟味し，投与対象も人体（成人）およびウサギ（体重約3kg）とし，着色料の投与は経口或は静脈内投与とした．この投与量はそれぞれの表に明記した．その定量法は次の通りである．

血液：ローダミン或はスルフォローダミンの一定量を経口或は静脈内投与し，一定時間毎に採血後，遠心により血清を分離（この際血清はローダミン或はスルフォローダミンによつて赤色を帯ぶ）し，これを各着色料を血清中に加えた標準溶液と比色定量した．

尿：着色料投与後一定時間毎に採尿し，ローダミン投与群は尿10ccに10％水酸化ナトリウム液1ccを加え，アルカリ性とした後，3倍量のエチルエーテルを加え良く振盪して，ローダミンをエーテル層に転溶させ，この操作を3回行つてエーテル層を集める．以後の実験は二法とし，一法はそのまま加温してエーテルを完全に留去し，これに新たに蒸留水10ccを加えて抽出物を溶解した場合と，他の一方はエーテル層に一定量の5％塩酸液を加え，振盪転溶した場合について行つた．いずれも操作後は標準液と対比して光電比色計で比色定量した．スルフォローダミン投与群は3倍量の塩酸々性アミールアルコールで振盪抽出し，これを石油エーテルをもつて所定量の蒸留水に移行，この操作を3回反覆して，すべての転溶液を集め，これを標準液と比色定量した．

糞便：投与後7～10日の間排泄したすべての糞便を採取し全量を蒸留水に溶解後，その一定量を取り遠心により上清を分離し，この沈澱に再び蒸留水を加えて操作を反覆，この上清総量より一定量採り，ローダミンの場合は水酸化ナトリウム液を加え，エチールエーテルに転溶した後，更に5％塩酸水に移行したのち，標準色と比色定量した．スルフォローダミンでは上清総量より一定量を採り，塩酸酸性アミールアルコールで抽出を行い，これを石油エーテルをもつて蒸留水に移行して標準液と比色定量した．定量はいずれの時も光電比色計によつた．

又実験の便宜上仮にローダミンを含む金花糖（43.7γ/g）を体重50kgの成人が200g食べPro. kg 約0.16mgの該色素が摂取されたと仮定して，この0.6mg/kgを食品1日採食料とした．

註：＊日本医科大学衛生学教室

実験成績

a）1回経口投与

1．ウサギ

ウサギ2匹を1群とし，これにローダミン0.174g/kg（マウスLD_{50}：食品1日採食量の約1,000倍量）および0.0174g/kg（マウスLD_{50}の1/10量：食品1日採食量の100倍量）を投与し所定時間毎に血中濃度および尿中排泄量を追求すると第1表に示す如く（代表例を示した）投与後30分～1時間で眼結膜は桃赤色を示し，尿もまた赤色調を示した．投与後5～7時間で血中濃度および尿中排泄量は共に最高値を示し，0.174g/kg投与群の血中最高値は22γ/cc，0.0174g/kgでは6γ/ccであつた．その後体内濃度は序々に減少したが，よく持続して排泄され，6～10日後においても実測された．この間の尿中排泄量は0.174g/kg投与群では投与量の2.16%，2.14%，0.0174g/kg投与群では5.75%，6.53%を示した．

これらに反しスルフォローダミンの経口投与においては，血中及び尿中いずれにもスルフォローダミンは検出されなかつた．そこで糞便中の排泄量を測定したところ，ローダミン投与の場合は食品含有量の約100倍では投与量の約4.7%，1,000倍量では約7.2%を示したが，スルフォローダミンではPro.kg0.029gで約15%，Pro.kg 0.2gで約18%を示し，ローダミンよりは吸収されにくい事が窺われた．

第1図　ローダミンの経口投与（ウサギ）による血中濃度及び尿中排泄(累積度)量

血清 {
- ……… LD_{50}（マウス）0.174g/kg投与量　0.5g（食品1日採食量の約1000倍量）
- ――・―― LD_5 /10（〃）0.0174g/kg 〃　0.045g（〃 100倍量）

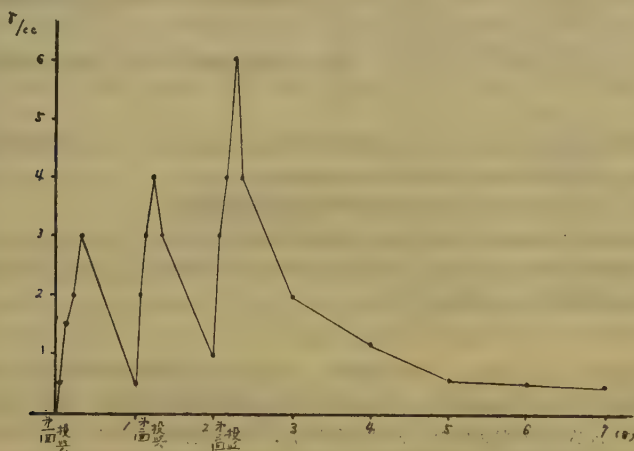
尿 {
- ―――― LD_{50}（〃）0174g/kg 〃　0.5g（〃 1000倍量）
- －・－・－ LD_5 /10（〃）0.0174g/kg 〃　0.045g（〃 100倍量）

2．人体

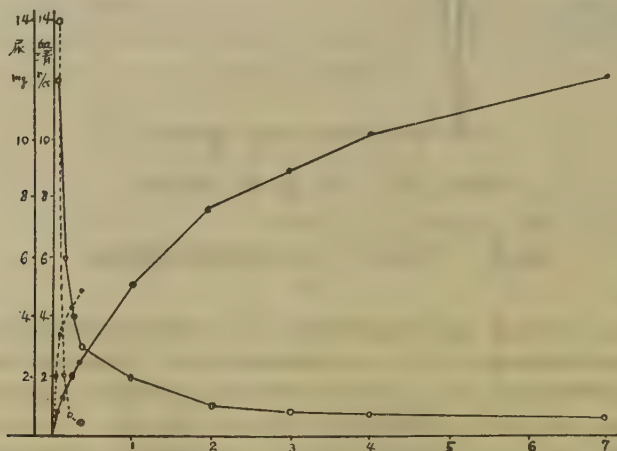
人体ではウサギよりも微量投与で，容易に吸収，排泄され，その血中移行量は個体によりかなりの差がみられた．すなわち1.6mg/kgと0.16mg/kgを投与したところ，投与後5～7時間で排泄量は最高値を示し，尿中総排泄量は1.6mg/kg量投与では43.7%であつた．しかし0.16mg/kg量投与では尿に殆んど赤色々調をみとめず．ローダミンを検出することは出来なかつた（第2図参照）．

第２図　尿中排泄量（累積）
宮　○　文　○　♂24
投与量　1.6mg/kg　（食品１日採食量の約10倍量）

b）連続経口投与

ウサギ（体重2.25kg）に16mg量（食品含有量の100倍量）を１日１回宛３回，24時間々隔で経口投与し，血中濃度の測定は，投与前および投与後１，３，５，７，および24時間目に行つた．24時間以後では前者と同じ間隔で測定し，最終測定時間は168時間におよんだ．この結果は第３図に示す如く着色料の投与を繰返すと，これに伴つて血中濃度は徐々に上昇し注目された．血中濃度最高値には大体５〜７時間で達し，ウサギに着色料を１回投与した際の最高値到着時間と一致している．その値は血清において，１回投与後は３γ/cc，２回投与後は４γ/cc，．３回投与後は６γ/ccを示した，これにより着色食品を連続摂取することにより体内に蓄積されたローダミンが相加され赤色々素或は中毒作用を呈する事などが懸念された．

第３図　ローダミンの連続経口投与（３回）における血中濃度

c) 静脈内投与

経口投与により，ローダミンでは，赤色々素尿を呈するが，スルフォローダミンでは，全くこのような現象は現われない．しかし便中からは検出された．したがつてスルフォローダミンはこれを経口投与した際には，血中ではほとんど呈色せざる範囲の微量吸収されるか，または全く吸収されないか，または吸収されてのち速かに呈色せざる形に分解されるかなどが一応考えられた．そこで投与法を経口法から静脈内投与法に変えて検べた．すなわちローダミンでは0.02g/kg（MLD/10），スルフォローダミンも0,02g/kg（MLD/1000）を生理食塩液に溶解させて静脈内投与し，血中濃度および尿中排泄量を時間的に計量したところ第4図に示す如くローダミンでは徐々に相当長期間持続して排泄され投与後6日目においても検出され，その排泄量は投与量の17%を示した．一方スルフォローダミンは静脈内投与では血中での証明は勿論，尿中から赤色尿として排泄されたが，その排泄速度はローダミンに較べると急速で24時間後では，もはや検出されなく，尿中排泄の総量は投与量の10.4%であつた．

第4図　ローダミン及びスルフォローダミンを静脈内投与したときの血中濃度及び尿中排泄（累積）量

ローダミン　o———o　血清　MLD/10（マウス）投与量0.02g/kg
　　　　　　•———•　尿
スルフォローダミン　o-------o　血清　MLD/1000（マウス）投与量0.02g/kg
　　　　　　•-------•　尿

したがつて酸性色素であるスルフォローダミンを塩基性色素のローダミンに比し，体組織の蓄積性が少なく，また容易に体内において変化されるのではないかと考えられる．

2. ローダミン，スルフォローダミンおよび食用赤色着色料の拡散性

生体内，特に胃または腸の色素吸収においてその色素の透過量は色素の分子の大きさによるが，拡散度，或は色素と環境のイオン濃度の適否や血管の拡張，収縮などと理化学的な条件によつて色々と制約されるが，これらのうち著者等は色素の拡散性について究明してみた．

実験方法

標準中試験管（径18mm，長さ170mm）に0.5%寒天（予め流水で十分水洗して清浄としたもの）および2%のゲラチンを別々に20ccずつ分注直立凝固させ，この上端に1%色素液を1cc宛重層し，25°の恒温室に放置し，3，5，24および48時間における色素の拡散度をノギスで測定した．供試着色料はローダミン，スルフォローダミン，食用赤色2号，および食用赤色101号，102号，103号，104号，105号までの計7種である．

実験成績

各着色料とも3～5時間の判定ではいまだ拡散中で一定した値は得られなかつた．24時間以後では安定した値を示した．そこで24乃至48時間観察時の成績をみると（第5表参照）スルフォローダミンでは23mmで最も拡散性に乏しく次いで食用赤色101号の24mmで，その他の着色料では27～28mmと類似の成績がみられた．結局スルフォローダミンが供試着色料のうちで最も浸透性が少く，分子の大きさが比較的大きいことを意味するが，先きの経口投与したときの血中での証明の困難さなどと考え合わせると興味深い．

第5表　各種着色料の拡散性

着色料 ＼ 区分 観察時間（時）	Ⓐ		Ⓑ	
	24	48	24	48
ローダミン	27	27	28	28
スルフォローダミン	23	23	23	23
食用赤色2号	28	28	28	28
食用赤色101号	24	24	24	24
食用赤色102号	27	27	26	26
食用赤色103号	28	28	27	27
食用赤色104号	28	28	28	28
食用赤色105号	27	27	26	27

註　表中数値の単位はmmとする．

総　　括

食品着色料の毒性について種々検討を加えてきたが，一般に塩基性色素は酸性色素に較べるとその毒性は著しく強い事が，著者ら[1]の急，慢性中毒試験においても窺われた．そこで食品より最も多数検出され，又毒性の強かつたローダミンを主体に吸収，生体内滞留期間，排泄状態についてその毒性との関係を究明し，それと時同に着色料の拡散度についても考察を加えた．

今ローダミン或はこれにスルフォン基の導入されたスルフォローダミンが経口的に与えられると，ローダミンは酸性域で，スルフォローダミンはアルカリ性域で良く溶出するが，溶出した色素は吸収，排泄という一定の運命を辿ることになるが，体内への吸収は胃内からの移行と腸管内よりの移行とに大別される．しかし或は全く血中への移行がみられず排泄されることも考えられる．水田[3]は供試色素54種のうち42種は食道より吸収され，このとき拡散度の比較的大なる色素は例外なく食道壁より吸収せられると興味ある報告をしているが，この吸収量は腸管などのそれに較べると著しく劣るという．胃からの吸収についてみると，小林[4]は供試酸性色素18種中12種が，塩基性色素13種中4種が胃より吸収されたところから胃は酸性色素でも塩基性色素でも吸収すると述べ，井上[5]は胃内移行の機作について究明しGlaessnerは胃酸過多症の時には健康者に較べて早く，胃酸欠乏症の時には遅く胃内へ移行するのをみて，この色素は胃酸分泌腺の働作によつて出るものであると述べているが，この報告を支持するといつており，その物理化学的の性質にしたがつて排出されるといつており，手島[6]は胃粘膜を強酸或は強アルカリで腐蝕させると，正常に較べると胃液中における濃度は低下し，排出持続時間は短縮すると云い，この機作の解明の複雑さを示している．アルコールは胃から大量吸収されるといわれ「デキストリン」および「ペプトン」も胃から吸収されるが糖類よりは少量であり脂肪および蛋白質は全く吸収されないという，小林[7]は色素をアルコール色素とするも，これによつてその拡散度が増加したものは2～3に過ぎず，しかもその増加も僅微で大部分のものは変化はないといつている．

腸管からの色素吸収に関しては，色素拡散度（分子量）によるとの説と，組織細胞内外の水素イオン濃度によるとの説があるが，このほか血管側の理化学的な制約も見逃がせない点といえる．田中[8-11]は酸性色素21種，塩基性色素21種について腸管よりの血中への吸収についてウサギを基に検べ，色素は酸性，塩基性を問わず実験色素数の70％は小腸粘膜より吸収され，この際塩基性色素は酸性色素よりも吸収され易く，小腸における色素の吸収

は十二指腸部は最も微弱で，廻腸が最も旺盛で，空腸はこれらの中間であるという．そこで著者らはローダミンおよびスルフォローダミンの吸収排泄について，人およびウサギについて検べてみた．

実験の都合上ローダミンの場合は仮にローダミンを含む金花糖を体重50kgの成人が200g食べPro. kg約0.16mgの該色素が摂取されるとの仮定を基準にした．投与法は経口法又は静脈内投与であるが，これの血中濃度はそれぞれの検体について比色定量（光電比色計）したところ，ローダミンを食品含有量の1,000倍，および100倍量経口投与したウサギは投与後30分～1時間で尿は赤色調を呈し5～7時間では血中濃度および尿中排泄量は共に最高値を示し，その後持続して排泄され6～10日にも及んだ．この間の尿中排泄量は1000倍投与では投与量の2.16%，2.14%，100倍量では5.75%，6.53%を示した．人体ではウサギよりも微量投与で赤色々素尿を認め，投与後5～7時間で排泄量は最高値を示し，その後相当長期間にわたつて徐々に排泄された．その尿中排泄総量は非常に多く，食品含有量の10倍量投与では24.6%，食品含有量では43.7%，これの1/10量では尿は殆んど赤色々調を認めず，ローダミンを検出する事は出来なかつた．

そこで投与もウサギに連続的に行つたところ，1回投与後の血中濃度最高値は血清において3γ/cc，2回投与後は4γ/cc，3回投与後は6γ/ccを示し，ローダミンを連続摂取すると体内に蓄積され，赤色尿或は中毒作用を現わすことが想起された．ところがスルフォローダミンを経口投与すると赤色尿は排泄されず，尿中からは全く検出されなく，また血中にも証明出来なかつた．そこでスルフォローダミンを溶解して静脈内投与したところ，尿は赤色調を示したが，ローダミンに較べると急速に排泄され，その尿中排泄総量は投与量の10.4%であつた，したがつて酸性色素であるスルフォローダミンは塩基性のローダミンに比し体組織の蓄積性は少なく，また容易に体内において変化されるのではないかと考えられる．

田中は酸性色素は拡散度が6.5以上あるものは例外なく腸管より吸収され，塩基性色素は拡散度が4.0以上のときにみられるという．この吸収濃度が，酸性色素に比して塩基性色素が高調を示すことは体組織および腸内容が共に「アルカリ」性の媒体なるが為であろうといつている．この点著者らも塩基性色素であるローダミンは酸性色素であるスルフォローダミンよりも血中移行が容易であることを実証したが，更に拡散についてみるとローダミンは27mmに対し，スルフォローダミンは23mmで後者は前者よりも分子量大であることが明らかになり以上の事実を肯定し得た．次でこれらの点を加味して便中からの排泄について検べてみた．この結果はローダミンは食品含有量の約100倍および1000倍量投与により，前者の場合は約4.7%，後者の場合は約7.2%を示したのに対しスルフォローダミンではPro. kg 0.02gで約15%，Pro. kg 0.2gで約18%で，投与量より勘案するとローダミンよりは吸収されにくく，この点が毒性の弱いことと関係があるのではないかと思われる．

文　献

1. 青山，宮沢，八田，小田，浦部，酒井，藤田：未報
2. 田村，東福寺：日本医事新報，1414，12 (1951).
3. 水田：実験消化器病学雑誌，2，439 (1917).
4. 小林：実験消化器病学雑誌，2，621 (1917).
5. 井上：実験消化器病学雑誌，2，429 (1917).
6. 手島：実験消化器病学雑誌，4，146 (1920).
7. 小林：実験消化器病学雑誌，2，448 (1917).
8. 田中：実験消化器病学雑誌，1，32 (1915).
9. 田中：実験消化器病学雑誌，1，145 (1915).
10. 田中：実験消化器病学雑誌，1，227 (1915).
11. 田中：実験消化器病学雑誌，2，571 (1917).

Summary

The result from examination on the density in blood and released urine of the food dyes (Rhodamine and Sulforhodamine) when they were adminstered to rabbits mostly through mouth or intravenously, were described.

Received June 18, 1957

Candida症の化学療法に関する実験的研究(第3報)
特に発育形態に関連して

宮　沢　文　雄

Experimental Study on Chemotherapy of Candidiasis. Ⅲ.
Especially, on the Form of Growth of *Candida albicans*.

Fumio MIYAZAWA

まえがき　著者は第一報[1]においてCandida症（以下C.症と略す）の発症機転について追求し，ウサギ血清中にて培養したCandida albicans（以下C. albicansと略す）はMycelium或はPseudomyceliumの形態を示して増殖するという興味ある知見を得たが，更にこの糸状菌様形態で発育せしめる因子及び形態と病原性との関連性について検討を進めてみた．なお実験に供したC. albicansは当教室保存菌4株（M_{10} 401，坂井，No. 2）Streptomyc-in 及びその他の抗生物質を長期間投与した結果二次的にC.症を併発したと思われる患者より分離した菌1株（内海）及び正常健康人口腔内より分離同定した菌2株（52，59）の計7株である．

1.　発育形態に及ぼす抗生物質の影響

発症機転とも関連して或る種の抗生物質は直接菌の発育を亢進するという考えがなされてきたが，いまだはつきりした結論にまでは至らない様である．著者の成績によれば，in vitroの実験でこの直接発育促進説は一応追認するまでには至らなかつたが，抗生物質を添加した際の菌の発育形態について観察を試みたところ，菌発育増殖像のあるものでは，糸状菌様形態の発育菌が散在し，ある種の抗生物質の存在は菌発育（形式）に何等かの影響を与えるのが窺われた．

実験方法　供試基礎培地としては2％ブドウ糖加サブローブイヨンを用い，Penicillin，Streptomycin 及び Chloramphenicol を100γ 1cc 濃度の割合に調製し，試験管に分注した．移植菌量は，あらかじめ基礎培地に培養したC. albicans の5～10万個（寒天平板培養法による）の範囲を移植し，37°C，24時間，48時間培養後の発育形態を顕微鏡下で観察した．

C, albicans の増殖度の測定方法としては，血球計算板を利用して直接菌数を実測する方法[2,3]，寒天平板混釈培養法，比濁法などが挙げられるが，著者は糸状菌様形態と酵母菌様形態の数的比率を求めるには Clump count method[1] が最も適していると思われるので，この方法に拠つた．鏡検法は塗抹，乾燥すると菌が凝集し算定にまぎらわしいが，ホールグラスに点滴し鏡検すると，個々の Clump が浮游しており算定し易いのでこの方法を用いた．なお一つのClumpに酵母菌様形態と糸状菌様形態とが見られる時は各々1個となし，総数500個を数え，その比率を求めた．

実験成績　第1表に示す如く，Penicillin, Streptomycin, Chloramphenicol（100γ/cc）などの抗生物質は供試菌株によつてかなりの開きはあるが，抗生物質非添加の対照に較べると糸状菌様形態発育の亢進がみられた．特にStreptomycin では顕著で興味深い．また培養時間を延ばし，48時間としても同様な発育形態を示した．

第1表　Candida albicansの糸状菌様形態の形成に及ぼす抗生物質の影響

抗生物質 ＼ 供試菌株	M_{10}	401	坂　井	No. 2	内　海	52	59
Penicillin	9.5	12.0	6.9	6.5	2.5	3.5	2.2
Streptomycin	20.0	18.6	18.0	7.6	8.3	9.5	3.5
Chloramphenicol	8.8	12.2	7.4	5.4	2.5	9.5	0
Control	2.8	3.4	0.5	1.0	2.4	2.0	0

註；抗生物質の濃度は各々 100γ/ccとした．
　　表中数値は24時間培養後の菌の糸状菌様形態の百分率（％）を示す．

2. 発育形態に及ぼすpH及び糖濃度の影響

従来 C.属真菌は至適pH域が比較的広いと考えられているが，生体のpHの変動は発症の誘因ともなりうるといわれるので[5]，著者はこの点を吟味する目的で pH の発育形態に及ぼす影響を検べた．また糖濃度を増減した時の作用についても追求してみた．

実験方法 供試培地はサブローブイヨンを用い，ブドウ糖添加濃度は１％，２％，３％及び５％とし，おのおの pH5.8及び7.2の液性中に溶存させた．移植菌量はサブロー寒天培地にて24時間培養の新鮮菌を生理食塩液にて均等浮游液となし，その５～10万個の範囲の菌量とし，いずれも 37°Cで培養し，培養24時間及び48時間後の発育状態について観察した．

実験成績 実験の成績は第２表に示す如くpH 及びブドウ糖濃度の差異は菌発育形態に特記すべき明確な影響を示さなかつた．

第２表 Candida albicansの糸状菌様形態の形成に及ぼす糖濃度並びにpHの影響

糖添加濃度(％)	供試菌株 / pH	M_{10}	401	坂井	No. 2	内海	52	59
1	5.8	1.8	2.5	0	1.2	0.8	0.5	0.5
	7.2	2.2	5.5	0	1.6	0.6	0	0
2	5.8	2.6	5.0	0.5	1.2	1.2	1.5	0
	7.2	2.8	6.0	0.5	1.4	1.6	0.5	0.5
3	5.8	4.2	7.3	0	1.7	0.8	1.0	1.0
	7.2	3.8	6.0	0	2.0	1.2	1.0	1.0
5	5.8	4.6	7.3	0	1.7	2.4	0.5	0.5
	7.2	4.0	6.0	0.5	1.8	1.5	1.0	1.0

註；表中数値は24時間培養後の菌の糸状菌様形態の百分率（％）を示す．

3. 発育形態に及ぼす血清の殺菌性

正常血清中にはある種の細菌に対して殺菌性を有するが，特に相沢[6,7,8]らは血清中の耐熱性のある物質（Bacteriocidin）と補体とが，その本態であると述べているが，この血清の殺菌性とC. albicansの発育形態との関係について実験を行つた．

実験方法 先ず無菌的に採取したウサギ血清に滅菌蒸留水を等量加え，56°C，30′ 及び 70°C，30′加熱，冷却後 C.albicansを移植し，37°C，24時間及び48時間培養後鏡検を行つた．

実験成績 血清を熱処理し殺菌性物質を不活性化した際の発育形態は加熱操作を加えないものと較べ両者の間は殆んど有意の差はないが，熱処理を加えた血清中の方が多少菌は菌糸形成をし易い様にみえる，即ち56°C，30′では殆んど差異は認められないが，70°C，30′では（血清は若干白濁した）糸状菌様形態の百分率は91.2％と幾分多い値を示した．

第３表 加熱血清中の Candida albicans の発育形態

	糸状菌様形態(％)
56°C，30′	85.1
70°C，30′	91.2
無処置	84.6

4. ウサギ血清分層中の C. albicansの発育形態

血清成分中にはC. albicansの発育の際，酵母菌様形態のほか糸状菌様形態の増殖を促す因子が存在すると思われるが，この発育因子が血清のいずれの分層に存在するか，まず血清Globulin分層と血清Albumin分層に二大別して究明してみた．

a 血清の分劃法

血清の分劃法には硫安塩析法を採用した．なお可及的にAlubumin とGlobulin を分劃する為に中間層として硫安45％ 乃至55％飽和の部分を除いて劃分を行つた，即ち飽和硫酸安門溶液をウサギ血清に対し45％の割合になるように徐々に添加し，析出物を遠心分離により集め， Globulin 分層を得た．次いで55％まで添加して生じた沈澱を遠心除去した後 Alubumin の等電点（pH4.8）に0.1％醋酸溶液をもつて調製し，析出物を遠心分離によつてAlubumin分層を得た．このAlubumin及びGlobulin分層は少量の蒸留水に溶かし流水にて透析を行つた後（硫酸安門及び醋酸のない事を確めた）凍結乾燥又は真空乾燥をもつて，おのおのの粉末を得た．

b) Albumin及びGlobulin分層中のC. albicansの発育形態

実験方法　前記分劃法によつて得た粉末Albuminを少量の蒸留水に溶かした後，5％濃度になる様に2％ブドウ糖加サブローブイヨンを加え，Seitz沪過滅菌を行い，2ccずつ試験管に分注保存した．血清Globulinも同様の方法にて調製した．この供試Albumin液及びGlobulin液にC. albicansの新鮮菌株（2％ブドウ糖加サブローズイヨン，24時間培養菌）を移植し，37°C，24時間及び48時間培養後の菌発育状態を鏡検により観察し，前述の方法にて発育形態を算定した．なお血清及び2％ブドウ糖加サブローブイヨンを同様手技で実験し，対照とした．

実験成績　第4表に示す如くClump count methodでは何れの供試菌株も血清及びAlbumin分層に於て特に菌糸をもつて発育する傾向がみられた．又この時の発育状態は血清＞Albumin分層＞Globulin分層＞2％ブドウ糖加サブローブイヨンの順に良かつた．

第4表　血清及び血清 Albumin，Globulin中の Candida albicans の発育形態

供試菌株	血清	血清Albumin	血清Globulin	2％Glncose Sabouraud bouillon
C. albicans M_{10}	85.9	28.1	9.2	2.6
〃 401	74.9	36.0	9.9	4.2
〃 坂井	60.6	16.3	1.0	0
〃 No. 2	58.4	21.2	2.4	0.8
〃 内海	77.2	20.2	6.1	1.6
〃 52	78.8	11.1	1.6	0.8
〃 59	55.2	1.4	0	0

註；表中数値は24時間培養後の菌の糸状菌様形態の百分率(％)を示す．

5. 菌株による糸状菌様形態の形成性とその毒性

ウサギ血清中に培養した糸状菌様形態のC. albicansは，サブロー培地にて培養した所謂酵母菌様形態のそれよりもマウスの敗血症死の死期を早め，かつ死亡率を高める事を第一報において報告したが，前述の実験の通り，菌株によつてこの糸状菌様形態の形成性に難易があるので，それのマウスに対する毒性との関連性について実験を進めてみた．

実験方法　供試菌株のおのおのについて2％ブドウ糖加サブロー寒天培地で培養した新鮮菌3mg（湿菌量）を体重10～12gの範囲のDD系健常マウスの腹腔内に接種し15日間の観察期間中のマウスの死亡状況を調べた．

実験成績　前述の血清中の発育状態とマウスに対する毒性とを対比して第5表に示したが，死亡百分率はM_{10}株の100％を除いて30乃至60％内外の値を示しており，血清中における菌株による糸状菌様形態の形成性と，その毒性との関連性について観察すると，この形態をとり易い菌株はマウスの死亡開始日数も比較的短時日に現われ又その死亡率も高い様に思われた．

第5表　Candida albicansの糸状菌様形態形成性と毒性との関係

供試菌株	血清培養による糸状菌様形態の百分率（％）	菌接種マウス		
		死亡開始日数	死亡数	死亡百分率(％)
C albicans M_{10}	85.9	2日	6/6	100
〃 401	74.9	8日	3/6	50
〃 坂井	60.6	6日	2/6	33
〃 No. 2	58.4	4日	2/6	33
〃 内海	77.2	2日	4/6	67
〃 52	77.8	3日	3/6	50
〃 59	55.2	8日	1/6	17
Cantrol(生理食塩液)			/6	0

註；表中死亡数の分母は動物数，分子はその死亡数を示す．

6. C. albicans の拡散因子

ある種の細菌特に肺炎双球菌，ウェルシー菌等が，その感染性に Hyaluronidase が関与しているといわれるが[12.13.14]，健康人から普通に検出される，C. albicans が異常発育をなし，病原性を示す際の組織像を観察すると酵母菌様形態のC. albicansと同時に Mycelium或いはPseudomycelium をもつて侵入している所謂糸状菌様形態のものがみられる．この組織侵襲性は菌の病原性に大きな関係があると思われるので，この糸状菌様形態と酵母菌様形態について拡散因子産生能を追求してみた．

実験方法　供試菌株としては従来用いてきた4菌株（M_{10}，401，内海，59）を選んだ．主として酵母菌様形態をもつて発育せしめる培地としては2％ブドウ糖加サブローブイヨンを用い，主として糸状菌様形態をとらしめるものとして，無菌的に採取したウサギ血清を使用した．サブロー寒天培地に培養した新鮮菌株をおのおの前述の培地に移植し，37°C に24時間培養し，おのおの特異の形態を有して発育している事を確め，その遠心上清液1容に良質な墨汁$^1/_2$容を加え，予め良く剪毛したウサギの背部皮内に0.3ccを注射し，その滲透性は拡散された面積をもつて比較した．

なお拡散面積は最長軸(D)，最短軸(d)を計測し，面積$S=\pi\dfrac{Dd}{4}$をもつて計算した．

実験成績　拡散面積は注射部位によつて多少の差がある様だが，背線部の両側に同一菌株の血清培養沪液及び2％ブドウ糖加サブローブイヨン培養沪液を注射して可及的にその部位による差異をさけて観察すると，前者の血清培養沪液の拡散面積は後者のそれよりも幾分広く，又対照との比較においても，その様な注射部位的条件を加味して考えても拡散因子をもつている様に思われるが，2％ブドウ糖加サブローブイヨン培養沪液では対照との比較において有意の差は見られなかつた．

第6表　Candida albicansの形態と拡散因子の関係

菌株	経過時間	ウサギ A		ウサギ B	
		血清培養沪液	2％Glucose Sabouraud bouillon 培養沪液	血清培養沪液	2％Glucose Sabouraud bouillon培養沪液
C. albicans M_{10}	1	4.0	2.5	4.0	3.1
	3	4.3	3.0	4.9	3.6
	48	6.1	3.1	6.1	3.6
401	1	2.7	1.8	3.3	1.7
	3	3.6	2.1	3.8	2.1
	48	6.1	2.7	4.3	2.4
内海	1	4.0	2.3	4.2	2.4
	3	4.1	2.8	5.2	3.5
	48	6.7	3.0	7.3	3.8
59	1	2.4	1.9	2.8	2.0
	3	2.6	2.0	2.8	2.0
	48	5.2	2.1	3.7	2.1
Control	1	2.4	2.0	2.9	2.3
	3	3.5	2.6	3.1	2.4
	48	3.5	3.0	3.6	3.0

註；表中数値は拡散面積（cm^2）を示す．

総　　括

C. albicans はその環境に応じて二つの形態をとり得るが，この明らかに異なる酵母菌様形態のものと糸状菌様形態のものとの間の毒性の相違について追求し，後者（血清培養菌）において特にマウスに対し高い死亡率を示した事は第1報[1]に記した通りである．

そこで更に糸状菌様形態をとらしめる因子及びその病原性との関連性について検討を進めてみた．

C. 症の発症機転にからんだ抗生物質の影響については既に詳述したが，実験的に抗生物質が直接菌の発育を促進するという説には賛否両論があり，著者は in vitro及びin vivo に抗生物質の影響を調べ，in vitroにはこの発育促進作用を一応否定する結果を示したが，マウスを用いたin vivoの実験ではStreptomycin，Aureomycinなど

は，その敗血病死を促進するという成績を得た．

従来抗生物質の細菌細胞の形態に及ぼす影響については種々の研究がなされ，特に上条[16,17,18]は大腸菌に対する作用を詳細に報告しているが，抗生物質を添加したin vitroの実験において，C. albicansの発育形態に注目してみたところ顕著とはいえないが，糸状菌様形態の菌数が増している傾向がみられた．

次にpHの変動もC.症の発症の一起因子[5]とされるむきもあるが，実験的に試験管内で行つたpH5.8及び7.2の間にみられる糸状菌様形態の形成性には，なんら影響はない様であつた．

又これと同時に試みた糖濃度の影響もブドウ糖の1%から5%の間では特記すべき形態の数的変化はない．

又相沢等[6,7,8]は正常血清中の殺菌性物質（Bacteriocidin）に就いて研究し．補体と耐熱性要素とよりなる殺菌性物質が菌体に吸着する事により殺菌作用を示すと述べているが，加温によつて補体を不活性化し，一応殺菌性を無くした状態の血清中でC. albicansを培養し，その発育形態を観察したが，殆んど影響を示さず，むしろ加温操作を加えない血清より糸状菌様形態の数は増している様である．

更に培養条件に関連して血清の粘調度についての考察は，血清が糸状菌様形態をとらしめるのに，これと同条件で抗菌濃度外のTriphenylmethan系塩基性色素を添加することによつて粘稠度には変化がないにも拘らず酵母菌様形態をなす[19]事から一応血清の粘調度には影響はないものといわねばならない．

又これに伴つて液体培養の際に，特にC. albicansが試験管の深部に発育する事から，血清の様に，ある程度粘調度をもつたものの培養条件には特に好気的或いは嫌気的な影響も考えられるので，著者は血清を約10%に加え調製した寒天平板培地で実験を行つたところ．対照として用いた2%ブドウ糖加サブロー寒天培地及び馬鈴薯寒天培地よりも良好に菌糸をもつて発育する傾向がみられる事を認めている．

血清成分中にはC. albicansの発育の際，糸状菌様形態の増殖を促す因子があると思われるが，従来C.属真菌は，健康人及び健康動物の常在菌として考えられ，著者も健康人口腔内より多数分離検出しているが，正常な血清中にこの菌群に対する抗体が存在するとも考えられるので，ウサギ血清を大きくAlbumin分屑及びGlobulin分屑に分け，各分屑中のC. albicansの発育形態について追求したところ，Albumin分屑に強い糸状菌様形態をとらしめる作用が認められ，一応Globulin分屑には発育形態に及ぼす影響も少いものと思われる．

これと同時にMalachite greenと各分屑との親和性について実験を試みたところAlbumin分屑に色素の脱色現象がみられ[20]，この色素が血清中では抗菌作用の著しい低下をきたすが．発育を酵母菌様形態をとらしめる作用を有するのは．色素とAlbumin分屑との結合性によるものと推察され前述の成績に関連して興味深い．

次にC. albicansは菌株によつて毒性に相当の差異があり，又血清中において新鮮分離当初より，その糸状菌様形態で発育し易いものと，比較的その形態をとりにくいものとに相当の差異があるので，この二つの間の関連性についてマウスの感染実験をもつて追求したところ，判然とした区別は出来にくいが，血清中で良く菌糸を出して発育する菌株程死亡開始日数は短かく，又その死亡率も高かつた．

この正常に存在する酵母菌様のC. albiansと糸状菌様のものとに組織侵襲性が異るであろうか．Duran-Reynalsら[9,10]は家兎や白鼠等の睾丸エキスが脳痘菌（Neurovaccine Levaditi）の感染力を増強する事を発見した．更にMcClean[11]は生理食塩水皮内注射の際に睾丸エキスを加えたところ，水泡が急速に消失していく事を観察し，これに墨汁を加えて現在のHyaluronidaseの測定法としての家兎皮内拡散試験法の基盤を作つた．細菌の拡散因子についてもDuran-Reynals[12]が連鎖球菌，ブドウ球菌の菌体自家融解液が睾丸エキスと同様な作用を有する現象を見出して以来Goodnerに[13,14]より肺炎双球菌に，McClean[15]らによりウェルシー菌，悪性水腫菌に拡散因子が発見され，菌の特異性がないためその菌の侵襲力のみならず，他の細菌の侵襲性をも高めると考えられている．

勿論，C. albicansは生体内において多数の菌と共存しているので，それによる影響も無視出来ないが，田中ら[21]，石山ら[22]は病理学的にC. albicansが菌糸をもつて組織内に侵入している事を報告し，又阿多[23]もC.症において敗血症を起した患者の血中より菌糸及び巨大胞子を有したC. albicansを検出している．著者はこの二つの形態の組織侵襲性について拡散因子の面から検討を進めてみたところ，ウサギを使用した皮内拡散法にて，血清中で糸状菌様形態をもつて発育した培養沪液の方に墨汁の拡散性の強い傾向がみられ，C. albicansは糸状菌様形態をなして発育する時，特にこの拡散因子を産生し，更に組織侵襲性を高めるものと思われた．

結　　論

C. albicnsの発育形態を中心に検討を進め次の結果を得た．

1. Streptomycin（100γ/cc）は顕著とはいえないが多少糸状菌様形態で発育せしめる傾向がみられた．
2. 培養基のpH及び糖濃度はその発育形態に認むべき影響を与えない様である．
3. 血清中の殺菌性物質と発育形態とは無関係のようである．
4. 血清Albuminは血清Globulinよりも糸状菌様形態をとらしめる作用が強い様である．
5. 血清中で特に糸状菌様形態をとりやすい菌ほど，マウスに対する毒性が強かつた．
6. 血清中で培養した所謂糸状菌様形態の C. albicansはその培養沪液に拡散因子を有する様である．

終りに臨み終始御懇篤なる御指導，御校閲を賜つた，恩師八田貞義博士に深甚なる謝意を表します．又種々実験に御支援下された岩原繁雄，藤井清次，中村正夫三博士に厚く御礼申上げます．また種々御助言をいただいた青山好作博士に厚く御礼申上げます．

文　献

1) 宮沢文雄：衛試，74，341，(1956).
2) Huppert, M., Macpherson, D. A., and Cazin, J. : *J. Bact.*, 65, 2 (1953).
3) Salvin, S. B., Cory, J. C., and Berg, M. K. : *J. inf, Dis.*, 90, 2 (1920).
4) 衛生検査指針（Ⅲ）(1951).
5) Foley, G. E., and Winter, W. D. : *J. inf. Dis.*, 85, 268 (1949).
6) 相沢憲，千葉重治，菊地太郎：日本衛生学雑誌，5，1，45 (1950).
7) 相沢憲，津田義一，川尻清次，菊地太郎：日本衛生学雑誌，6，3，115 (1951).
8) 相沢憲，熊谷一雄，川尻清次，菊地太郎：日本衛生学雑誌，6，3，124 (1951).
9) Duran-Reynals, F. : *J. Exp. Med.*, 50, 327, (1929).
10) Stewart, F. W., and Duran-Reynals, F. : *J. Exp. Med.*, 50. 341 (1929).
11) McClean, D. : *J. Path. and Bact.*, 33, 1045 (1930).
12) Duran-Reynals, F. : *J. Exp. Med.*, 58, 161 (1933).
13) Goodner, K. : *J. Exp. Med.*, 54, 847 (1931).
14) Goodner, K. : *J. Exp. Med.*, 58, 153 (1933).
15) McClean, D., and Hale, C. W. : *Bioch. J.* 35, 159 (1941).
16) 上条清明：日本細菌学雑誌，9，129 (1954).
17) 上条清明：日本細菌学雑誌，9，193 (1954).
18) 上条清明：日本細菌学雑誌，9，253 (1954).
19) 宮沢文雄：衛誌，74，349 (1956).
20) 宮沢文雄：衛誌75号掲載予定.
21) 田中開．田中昴：第4回日本化学療法学会総会講演 (1956).
22) 石山俊次，石山功，隅田正一：日本化学療法学会雑誌，4，360 (1956).
23) 阿多実茂：綜合医学，12，691 (1955).

Summary

The author reported that the influence of antibiotics, pH, concentration of glucose, serum albumin and serum globulin on the form of growth of Candida albicans, and the difference of spreading factor between mould form of Candida albicans and yeast form of it.

Received June 18, 1957.

Candida症の化学療法に関する実験的研究（第4報）
特に各種薬剤のin vitro及びin vivoに於ける効果

宮　沢　文　雄

Experimental Study on Chemotherapy of Candidiasis. IV.
Especially the Effect of Chemotherapeutic Agents on Candidiasis *in Vitro* and *in Vivo*.

Fumio MIYAZAWA

まえがき　著者は Candida 症（以下C.症と略す。）の化学療法剤について多角的な検討を加えてきたが，液体培地中では非常に高い菌感受性を示しその抗菌性が期待されたTriphenylmethan 系塩基性色素も，それに血清を添加すると，この抗菌力は著しく低下する事を報告したが，更にその抗菌作用機作について二,三検討を加えると共に抗C.作用を有する薬剤などとC. albicansに対する感染防禦実験を行つたので以下この成績について報告する.

1.　血清中における薬剤の抗菌力と発育形態

実験方法　第1報及び第2報に述べた様に血清培養した所謂 Candida albicans（以下 C. aid. albicans と略す）の糸状菌様形態はサブロー寒天培地に培養（酵母菌様形態）したそれよりもマウスの敗血症死を早め，又死亡率も高かつたが，Triphenylmethan 系塩基性色素は血清中で菌の発育を阻止し得ない濃度でもその発育形態を酵母菌様に変えるが，著者は更に添加された色素濃度と，この二つの形態の数的比率との関係を従来述べた同様な方法（Clump count method[3]）で観察を行つた.

又Merzonin，Trichomycin についても同時に実験を試みた.

実験成績　供試菌株には C. albicans M_{10} を用いたが．Triphenylmethan 系塩基性色素である Malachite green 及びBrilliant green の抗菌力は1万倍稀釈濃度以下となり，血清無添加（2%ブドウ糖加サブローブイヨン）時の抗C.価 100万倍に較べると約 1/100 倍以上に逓減したが，酵母菌様形態の数的比率は1万倍稀釈濃度で100%の値を示し，又 Gentian violet，Crystal violet及びMethyl violetなどは5万倍稀釈濃度に抗菌性は保持され，発育をゆるした 10万倍濃度域では総て酵母菌様形態をなして発育している像がみられた．おのおの色素の稀釈段階が高まるにつれて糸状菌様形態の比率が増加し，対照に近い値となる．この際のC. albicansの形態は可逆的で血清中に後培養すると再び菌糸を有して発育するのがみられる．これらの色素に反して Merzonin，Trichomycin では抗菌作用の示さない濃度では総て対照と同様に大部分が糸状菌様形態をなしている事がわかつた.

第1表　血清中の Candida albcians の発育形態に対する色素濃度の影響

供試剤	発育形態	試剤稀釈濃度					対照
		1万	5万	10万	50万	100万	
Malachite green	Yeast form	100.0	94.8	91.9	72.4	56.7	15.4
	Mould form	0	5.2	8.1	27.6	43.3	84.6
Brilliant green	Yeast form	100.0	96.1	92.4	63.5	47.9	—
	Mould form	0	3.9	7.6	36.5	52.1	—
Gentian violet	Yeast form	—	—	100.0	93.5	87.1	—
	Mould form	—	—	0	6.5	12.9	—
Crystal violet	Yeast form	—	—	100.0	94.4	88.7	—
	Mould form	—	—	0	5.6	11.3	—

供試剤	発育形態	試剤稀釈濃度					対照
		1万	4万	10万	50万	100万	
Methyl violet	Yeast form	—	—	100.0	93.8	87.4	—
	Mould form	—	—	0	6.2	12.6	—
Merzonin	Yeast torm	—	—	—	19.1	14.2	—
	Mould form	—	—	—	83.8	85.8	—
Trichomycin	Yeast form	—	—	—	15.9	13.3	—
	Mould form	—	—	—	84.2	87.1	—

註：判定は37°C，48時間培養とし表中数字は百分率（%）を示す．

2. 合成色素の抗菌作用

元来合成塩基性色素は $-NH_2$ 或いは $-N(R)_2$ の塩酸塩又は硫酸塩として助色団を形成しているために，そのpHによつては色素自体の安定性を欠き，抗菌性に影響を及ぼす事も考えられるので，体液pHにおける色素の抗菌作用をしらべてみた．

実験方法 あらかじめ10%苛性ソーダ液でpH7.2に調製した2%ブドウ糖加サブローブイヨンで，供試剤を所定濃度に稀釈した．この供試稀釈濃度の範囲及びC. albicans の移植菌量は前報[2]と同様である．

実験成績 各供試薬剤及びその抗菌性は第2表に示したが，一部の供試剤を除くと，pH5.8の培養基の際と殆んど変りなく，合成色素で最も抗菌作用の強かつたのはDimethyl 或いは Diethylamineの形をとつたTriphenylmethan 系塩基性色素で Malachite green，Brilliant green，Gentian violet，Crystal violet，Methyl violetなどは50万～100万倍稀釈濃度で完全にその発育を阻止した．併しFuchsineでは総ての供試菌に対して1万倍稀釈濃度以下となつた．

Thiazine系色素のMethylen blue，Acridine系色素のAcriflavineなども5万～10万倍濃度に抗菌性が窺われた．

また対照として抗菌作用の全然見られなかつたGuinea green B，Light green SF 黄についても同様に実験を行つたが，これらの色素は Triphenylmethan 系酸性色素で pH がアルカリ性側では比較的安定しているが，pH7.2 では抗菌作用は認められず，いずれの菌も1万倍稀釈濃度でも発育した．又参考迄に色素の以外の薬剤として Merzonin，Trichomycinについても，pH7.2でその抗菌作用をしらべたが，前と同様に100万倍程度に抗菌性が保持されることが認められた．

第2表 Candida属真菌に対する合成色素の抗菌作用（その2 pH7.2）

菌種 / 供試剤	C. albicans	C. tropicalis	C. guilliermondi	C. krusei	C. parakrusei	C. pseudotropicalis	C. stellatoidea
Malachite green	100	50	50	50	50	100	50
Brilliant green	100	50	100	50	50	100	100
Gentian violet	100	100	100	50	50	100	100
Crystal violet	100	100	100	50	100	100	100
Methyl violet	100	100	100	50	100	100	100
Fuchsine	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Guinea green	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Light green	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Methylen blue	5	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Acrinol	10	5	10	5	5	10	5
Merzonin	100	50	100	50	100	100	100
Trichomycin	100	100	100	5	100	100	100

註：表中数値は抗菌濃度（N×10,000稀釈）を示す．

3. 合成色素と血清分劃との親和性

血清中に色素溶液を添加すると急速にその色調が消褪していくのがみられ，これと同時に抗C.作用も消失した

が，血清並びに血清 Albumine 及び Globulin につき，これに色素を共存させた時の色素の褪色状況について吟味してみた．

実験方法　ウサギ血清又び硫安塩析法にて可及的に分割したウサギ血清Albumin 及び Glbulinの 5 %溶液，蒸留水，2 %ブドウ糖加サブローブイヨンのおのおのについてpH. 5. 8と7. 2にの燐酸緩衝液にて調製した．

これにMalachite green, Brilliant green, Gentian violet, Crystal violet, Methyl violet, Methylen blue, Acrinol の10万倍稀釈水溶液を等量加え，添加後時間を追つて褪色状態を観察した．

実験成績　おのおのの色素は蒸留水及び 2 %ブドウ糖加サブローブイヨン中でpH5. 8 及び 7. 2のいずれにおいても安定した性質を示した．これに反し血清中ではMalachite green 及びBrilliant greenは急速に色調は消褪し，添加後10分以内で完全に褪色された．これを各分屑について観察すると血清 Albumin 特に pH7. 2 の状態で同様な褪色現象を起すのがみられ，pH5. 8 ではその褪色時間は比較的遅かつた．又血清 Globulin では血清及び血清Albumin に比し褪色されにくく，殆んど色調は残存するのが認められた．

Gentian violet, Crystal violet, Methyl violet は血清中でも若干色調は残存するが，血清Albumin にも同様な傾向がみられ，特にpH7. 2でも完全には失われなかつた．血清Globulinでは強い色調の変化は窺われなかつた．

第3表　血清及び血清分劃による各種色素の褪色度

供試剤 ＼ 区分	経過時間（分）	Serum	血清 Albumin		血清 Globulin		蒸留水		2%Glucose Sabouraud bouillon	
PH		7.2	5.8	7.2	5.8	7.2	5.8	7.2	5.8	7.2
Malachite green	5	+	+++	+	+++	+++	++++	++++	++++	++++
	10	−	+++	+	+++	+++	++++	++++	++++	++++
	30	−	++	+	+++	++	++++	++++	++++	++++
	60	−	++	−	+++	++	++++	++++	++++	++++
	24時	−	+	−	+++	++	++++	++++	++++	++++
Brilliant green	5	+	++	+	+++	+++	++++	++++	++++	++++
	10	−	++	−	+++	+++	++++	++++	++++	++++
	30	−	+	−	+++	++	++++	++++	++++	++++
	60	−	−	−	+++	++	++++	++++	++++	++++
	24時	−	−	−	++	++	++++	++++	++++	++++
Gentian violet	5	+++	+++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++
	10	++	+++	++	+++	+++	++++	++++	++++	++++
	30	++	+++	++	+++	+++	++++	++++	++++	++++
	60	+	++	+	+++	+++	++++	++++	++++	++++
	24時	+	+	+	+++	+++	++++	++++	++++	++++
Crystal violet	5	+++	+++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++
	10	++	+++	++	+++	+++	++++	++++	++++	++++
	30	++	+++	++	+++	+++	++++	++++	++++	++++
	60	++	++	++	+++	+++	++++	++++	++++	++++
	24時	+	+	+	+++	+++	++++	++++	++++	++++
Methyl violet	5	+++	+++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++
	10	++	+++	++	+++	+++	++++	++++	++++	++++
	30	++	++	++	+++	+++	++++	++++	++++	++++
	60	+	++	+	+++	+++	++++	++++	++++	++++
	24時	+	+	+	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Acrinol	5	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	10	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	30	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	60	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	24時	++	++	++	++	++	++++	++++	++++	++++
Methylen blue	5	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	10	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	30	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	60	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	24時	+++	++++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

註：表中 − 完全褪色，＋ 殆んど褪色，++ 中等度褪色，+++ 稍褪色，++++ 無変化を示す．

4. C. albicans感染マウスに対する薬剤の効果

a. 供試薬剤の毒性

in vitroの実験で抗C.作用を有する二，三の期待される薬物について，感染防禦実験の際の投与量を選定するために先ず毒性実験を行つてみた.

実験方法　供試薬剤として選んだものは色素剤として血清中でも抗菌力の残存したGentian violetを挙げ，又Malachite greenは血清と拮抗し，著しく抗菌力が低下したが，前者に対比するものとして，その発育を酵母菌様形態になすので取り入れた.

水銀剤は Mezonin を，又生物学的製剤としては Trichomycin を選び，おのおの所定量を 12g内外の 5 匹を一群とする D.D 系マウスの腹腔内に投与し，投与後 7 日目の急性中毒致死量（LD_{50}）をVan der waerden の面積法にて求めてみた.

実験成績　一般に Triphenylmethan 系塩基性色素は毒性強く，特に実験に選んだ Malachite green（Merch製）は投与後 24～48 時間以内に急性死するものが多く，その致死量も LD_{50} 8.63±1.02mg/kg と算定された. Gentian violetは 7 日間の観察期間中に徐々に中毒死してゆき，そのLD_{50} は15.84±1.01mg/kgと前者に比して比較的毒性の少い値を示している.

又 Merzonin 及び Trichomycin の急性中毒致死量もおのおの70.7±1.01mg/kg 及び 21.06±1.01mg/kgと実測された.（第 4 表参照）

第 4 表　供試薬剤の毒性

	致死量（LD_{50}）
Malachite green	8.63±1.02mg/kg
Gentian violet	15.84±1.017mg/kg
Merzonin	70.7±1.01mg/kg
Trichomycin	21.06±1.01mg/kg

b. 供試 C. albicansの毒性

前にも述べた様に C. albicans は菌株によつてその毒性に相当の差異がみられるので，その感染防禦実験を行うに供試菌株のマウスに対する毒性について吟味し，その接種菌量を定めた.

実験方法　供試菌株は C. albicans M_{10}が最もマウスに対する毒性が強いようなので，これを選んだ. 2 %ブドウ糖加サブロー寒天培地に37°C24時間培養した新鮮菌(10mg，5mg，3mg 1 mg，及び0.5mg（湿菌量）を生理食塩液に均等浮游液となし）D.D系マウスの腹腔内に接種し，その死亡状態を観察した．なお観察期間は15日間で， 6 匹を 1 群としたマウスに C. albicansの各投与量を接種した.

実験成績　試験成績は第 5 表に示したが大量の菌をマウスの腹腔内に接種すると，その死亡開始日数は早く，又その死亡率も高かつた. 即ち C. albicans, 10mg 接種群では接種後24時間以内に大半は死亡し，（ 6 匹中 4 匹）4 日以内に全頭が死亡し， 5 mg 接種群でも同様に 9 日目には全頭が死亡するのがみられた. 3 mg 接種群の死亡状態は 2 日目よりはじまり12日目でその死亡率は 100 %を示した. 1 mg接種群では，マウスはこの菌接種に耐え，15日間の観察でも生存するものがあり，その死亡率は 50%を示した. 又0.5mg 移植では全頭が生存するのが認められた.

この際，死亡マウスを解剖して観察すると，肝臓，腎臓などに無数の小さな白斑を形成しているのがみられ，この状態は菌接種後急激に短期間で死亡したものより，比較的長時日を経過して死亡したものほど強く現われた. また耐過生存したマウスも撲殺，解剖したがその病変は弱いが，同様に小さな白斑を腎臓などに形成していた.

第 5 表　Candida albicans 接種菌量と毒性

接種菌量（湿菌量mg）	死亡マウス		
	死亡開始日数	死亡数（15日目）	死亡率（%）
10	1 日目	6/6	100
5	1 日目	6/6	100
3	2 日目	6/6	100
1	9 日目	3/6	50
0.5		0/6	0

註 ： 表中死亡数の分母は動物数，分子はその死亡数を示す.

C.　感染防禦実験

実験方法　供試動物にはD. D系健常マウスを用い6匹を1群とした．予め2％ブドウ糖サブロー寒天培地に24時間培養したC. albicans新鮮菌をマウスの腹腔内に接種した．なお接種菌量は比較的長期間に徐々にマウスをたおし，死亡率も100を示し，また典形的な病巣を作つて，その正常な感染性を示していると思われるC. albicans M_{10}株の3 mg（湿菌量）を接種した．供試薬剤の投与量は著者が算定した急性中毒致死量（LD_{50}）の1/10量でC. albicans接種直後薬剤を投与した群と接種24時間後の群とに分けて，マウスの腹腔内に3回1日1回投与し，その後対照群（生理食塩液投与群）とその死亡状態を比較しながら15日間観察を行つた．

実験成績　菌接種直後に薬剤を投与した感染防禦成績を第6表，その1に示したが，対照である抗真菌剤の非投与群では，その死亡率は100％を示し，その死亡開始日数も，10日以内に大半は死亡した．

これに較べ色素剤としてのGentian violet投与群は死亡開始日数も7日と相当の死期延長効果がみられ，又死亡率も17％を示したが．Malachite greenでは多少その効果は少なく6匹中3匹（50％）が死亡した．

水銀剤として比較的毒性の軽微なMerzoninの効果は死亡率67％，死亡開始日数も2日目と殆んど効果は認められなかつた．

これらに反し近年抗C.性抗生物質として賞用されているTrichomycinでは完全に，その感染を阻止し全頭が生存する成績を得た．

また菌接種24時間後に薬剤を投与した成績は第6表その2に示したが，いずれの薬剤も特記すべき死期延長効果は認められず，その死亡率も，多少の効果がみられたTrichomycinで17％，Gentian violetで33％を示し，Malachite green及びMerzoninでは殆んど効果は認められなかつた．

第6表その1　Candida albicans感染マウスに対する各種薬剤の効果

供試剤	死亡マウス		
	死亡開始日数	死亡数（15日目）	死亡率（％）
Malachite green	4日目	3/6	50
Gentian violet	7日目	1/6	17
Merzonin	2日目	4/6	67
Trichomycin		0/6	0
対照	2日目	6/6	100

註：各試剤は菌移植直後投与した　表中死亡数の分母は動物数，分子はその死亡動物数を示す．

第6表その2　Candida albicans感染マウスに対する各種薬剤の効果

供試剤	死亡マウス		
	死亡開始日数	死亡数（15日目）	死亡率（％）
Malachite green	4日目	5/6	83
Gentian violet	4日目	2/6	33
Merzonin	2日目	6/6	100
Trichomycin	3日目	1/6	17
対照	2日目	6/6	100

註：死亡開始日数は菌移植よりの日を示す．
各試剤は菌移植後24時間目より投与した．表中死亡数の分母は動物数，分子はその死亡動物数を示す．

総　　括

抗生物質の進歩普及に伴なつて特に注目されてきたC.症の化学療法剤の検索を著者は色素剤を中心に追求してきたが，更にその菌抗作用について，その菌学的な立場からも観察を加え，毒性の面にも触れて検討をしてみた．

従来Triphenylmethan系色素の抗菌作用については，Eisenberg[4]の主張する所謂グラム特異性，或いはKawai[5]の述べた胞子特異性と呼ばれる如く，グラム陽性菌及び胞子形成菌に対し，特異的に抗菌性を示すが，著者も既に基礎培地（2％ブドウ糖加サブローブイヨン，pH.5.8）を用いた際の色素剤並びに抗真菌剤について広範な実験を進め，C.属真菌に対しても，Triphenylmethan系塩基性色素に特に強い抗菌作用の見られる事を報告したが[2]，血清中ではその抗菌性は強く拮抗され，Malachite green及びBrilliant greenでは1万倍稀釈濃度以下，Gentian violet, Methyl violet, Crystal violetでは5万倍と著しく逓減された．この様に色素剤の抗菌作用は体液と著しく拮抗される事はBurkeら[6]も報告しているが，先きに著者は血清中でC. albicansを培養すると大部分が糸状菌様形態で発育する事を認め，この形態の菌は，菌糸をもつて増殖した所謂酵母菌様形態のものより毒性の強い事を報告したが[1]，血清中の該色素の抗菌作用を菌の形態上より観察すると色素濃度が高い程酵母菌様形態で増殖する事を認めた．即ち発育を阻止しなかつたMalachite green, Brilliant greenの1万倍稀釈濃度，Gentian violet, Crystal vilet, Methyl violetの10万倍稀釈濃度で総ての菌は酵母菌様形態で発育しており，更に稀釈段階を上げると糸状菌様形態のC. albicansがみられ，この色素濃度と糸状菌様形態の比率とは反比例的であつた．これらに反し基礎培地中で100万倍稀釈濃度に抗菌作用のみられたMerzonin及びTrichomycinでは血清中では10万倍程度と約1/10倍に逓減し，また無効濃度域に至ると直ちに大部分が糸状菌様形態で発育する事が認められた．

また今まで述べてきたTriphenylmethan系塩基性色素の化学構造はDimethylamin又はDiethylamineの塩酸塩或いは硫酸塩として助色団を形成しているので，供試培地のpHがアルカリ性側では色素自体の安定性を欠く事があり，当然生体体液pHにおける抗菌性についても疑問が持されるが，pH7.2に調製した2％ブドウ糖加サブローブイヨンを用いC.属真菌に対する抗菌作用を検べてみたところ一部の菌を除けば第2報に報告した成績とそれ程有意の差異はみられなかつた．

しかし血清中に該色素を添加すると急速に色調は消褪していくのがみられ，これと同時に色素の抗菌性も失われる様なので，色素の褪色度をもつて血清の親和性，ひいては拮抗性を推察してみた．血清を大きくAlbumin分層及びGlobulin分層に分け，そのおのおのの分層溶液によつて褪色される状態を観察したが，血清中ではMalachite green, Brilliant greenは色素溶液添加後（最終色素濃度は20万倍稀釈濃度）10分以内に完全に色調が失われた．これを各分層でみると，血清Albuminにこの傾向がみられ，特に血清と同様に溶液のpHが7.2の際に褪色性が強く，pHが酸性側では色調が相当残存するのが窺われた．これに反し血清Globulinでは．その褪色性は非常に弱い．

この傾向はGentian violet, Crystal violet, Methyl violetにも認められたが，血清中で抗菌力が残存すると同時に，完全には色調も消失しなかつた．その褪色の度合は血清Albumin分層の，特にpH7.2の際に強くみられた．

この際対照として2％ブドウ糖加サブローブイヨン及び蒸留水のpH5.8及び7.2のおのおのを用意し，供試色素の安定性をみたが，いずれの場合にも色素は安定した色調を呈していた，これらの褪色された血清及び分層溶液中の蛋白質を沈澱させ色素分子を一定の化学的操作を施して溶出せしめると再び色調を呈する事が窺われた．

結局血清成分中血清Albuminに，特にpHアルカリ性側で親和性があり，助色団の作用が打ち消され，その色調が消失すると同時に抗菌作用の低下を来たすものと推察された．又前報[1]において血清中特に血清AlbuminがC. albicansの発育を糸状菌様形態をとらしめるものと推察されたが，Triphenylmethan系塩基性色素がAlbumin分層と親和し，その結果酵母菌様形態で発育するものと思われた．

次に抗菌作用のみられた薬物を動物実験に応用するに，その毒性を測定し，投与量を選定するためにD.D系マウスを用いて腹腔内注射による50％致死量を計測してみた．

色素剤としては血清中でも相当に抗菌力の残存したGentian violet，及び抗菌力は著しく漸減したが，C. albicansの発育に影響し酵母菌様形態をとらしめたMalachite greenを選んだが，そのおのおのの毒性は，前者では15.84±1.01mg/kg，後者では8.63±1.02mg/kgと算定された．

水銀剤としての Merzonin では70.7±1.01mg/kg，また近年特に抗C.剤として，実験的にも臨床的にも認められてきた[7-10]Trichomycinの毒性は21.06±1.01mg/kgと算定され，善甘ら[7] の報告と大体一致した成績を得た．

C. albicansの感染防禦実験の際の接種菌量は最も正常な感染性を示したと思われる湿菌量として 3 mgの腹腔内接種を選んだ，即ちこの投与群は 10 日目前後と比較的観察期間の中期より後期にわたつて死亡するものが多く，肝臓，腎臓などと典形的な無数の小白斑を形成する．

供試薬剤の投与量は致死量（LD_{50}）の 1/10 量を用いたが，その中で特に著効を示したのは，Gentian violet 及びTrichomycin で，又菌接種後直ちに薬剤を投与した際に良く感染死を防ぐ事が出来，また若干延命効果も期待出来た．即ち対照の死亡率100%に対し，前者投与群では17%，後者投与群では 0 %と完全に感染死を阻止した。併し菌接種後24時間より薬剤を投与したものでは効果が症下した。

血清中で大幅に抗菌力の低下をきたしたMalachite greenでは菌移植直後の薬剤投与ではその死亡率50%と多少効果がみられる様であつたが，菌接種後時間を経過した際の効果は少ない．Merzoninではいずれの場合にも著効は認められなかつた．

結　　論

C. albicansに対するTriphenylmethan 系塩基性色素及びその他の抗真菌剤の抗菌作用についてin vitro 及びin vivoで検討した．

1.　Triphenylmethan系塩基性色素は，その抗菌濃度外では，色素濃度が高い程血清中のC. albicansを酵母菌様形態にする．

2.　血清中で Merzonin，及び Trichomycin は抗菌力は10万倍稀釈濃度程度にみられるが，抗菌濃度外の発育は，大部分が糸状菌様形態をなす．

3.　Dimethyl或いはDiethylanilin の形を有する Triphenylmethan 系塩基性色素は一部の菌を除いて基礎培地（pH7.2）でも強い抗菌性がみられた．

4.　Triphenylmethan系塩基性色素は特に血清Albuminに親和性がある．

5.　Gentian violet及びTrichomycin はマウスの C. albicans 感染防禦効果が多少みられた．

終りに臨み終始御懇篤なる御指導，御校閲を賜わつた恩師八田貞義博士に深甚なる謝意を表します．また種々実験に御支援下された岩原繁雄，藤井清次，中村正夫三博士に厚く御礼申上げます．また種々御助言をいただいた青山好作博士に厚く御礼申上げます．

文　　献

1)　宮沢文雄：衛試，74，341（1956）.
2)　宮沢文雄：衛試，74，349（1956）.
3)　宮沢文雄：衛試75号掲載予定.
4)　Eisenberg，P.：*Zentralblatte für Bakt. Para. und Inf. Krank., Originale* 71，420（1913）.
5)　Kawai N.：*Zentralblatt für Bakt. Para. und Inf. Krank., Originale,* 115，241（1930）.
6)　Burk，V., and Skinner，H.：*J. Exp. Med.*, 41，41（1925）.
7)　善甘義夫，池本秀雄，近藤秀雄，福島孝吉，金子克己：日本化学療法学会雑誌，1，77（1952）.
8)　鈴木成美，中沢昭三：日本化学療法学会雑誌，4，257（1956）.
9)　田中実：慶応医学，30，358（1952）.
10)　岡野実；日本内科学会雑誌，43，329（1952）.

Summary

The author experimented the effect of various chemotherapeutic agents on Candidiasis in vitro and in vivo. Especially Gentian violet (Triphenylmethan basic dye) and Trichomycin (Antibiotics) inhibited the growth of Candida albicans in serum and inhibited the death of mouse from Candida infection.

Received June 18, 1957.

学童大便その他よりの病原性大腸菌検出について

山地幸雄，田中弘子，志波　剛，石関忠一
小嶋秩夫，金本珠子

On the Determination of the Pathogenic *Escherichia coli* from Stools of Children and Others.

Yukio YAMAZI, Hiroko TANAKA, Tsuyoshi SHIBA,
Chuichi ISHIZEKI, Tsuneo KOZIMA and Tamako KANAMOTO

まえがき　*E. coli* O-111，O-55及びO-26などの特殊の大腸菌によつて，乳幼児あるいは時として成人の下痢が起ることは，近時諸外国及び本邦において報告され，病原性を発揮し得るもの，あるいはその疑いのある大腸菌としては，以上の3型の他にO-25，O-44，O-75，O-86，O-112，O-119，O-124，O-125，O-126，O-127，O-128，O-136などが挙げられる.[1-8]

本症の感染源としては乳幼児の患者，保菌者のみならず，家庭その他において乳幼児と生活を共にする一般人にも，注意を向けなければならない．健康成人，健康児あるいは下痢なき小児よりの，病原大腸菌の検出については，わが国においてもいくつかの報告があり，本菌による下痢症患者に接触しない健康人大便からの病原性大腸菌，特にO-111，O-55，O-26の3型の検出は稀であるとされている[8-17]．われわれはさきに，都内某小学校学童大便，食品関係などよりCitrobacterの検出を試みたが[18]，その際同時に得られた大腸菌その他について，*E. coli* O清による血清学的同定を行なつたので，その大要を報告する

実験方法

菌株の分離　都内某小学校2年生1学級43名の検便を行なつた際は，マッコンキー寒天，BGLB培地及びEMB培地を用いて型のごとく分離培養を行ない，生じた集落3～8個よりの株につき，グラム陰性，無芽胞性の杆菌であることを観察すると共に，固有運動，ブドウ糖，乳糖，蔗糖など糖類及び高級アルコールの分解，インドール反応，Voges-Proskauer，メチールレッド，サイトレイトの各試験及び硫化水素産生，ゼラチン消化，尿素分解の有無など，各種生物学的性状を検査した．学童大便以外の材料についても同様の方法によつたが，学童及び下痢患者大便についての実験以外の場合には，*Citrobacter* 検出が主目的であつたので，硫化水素非産生菌は実験の対象より原則として除いた.

凝集反応　血清学的試験は*E. coli* O-25，O-26，O-44，O-55，O-75，O-86，O-111，O-112，O-119，O-124 O-125，O-126，O-127など病原性が公認されたか，あるいはその疑いがあるとされているものの抗O血清の他，これらのO抗原と関係があると報告されているO-7．O-48，O-73，O-90，O-113[16,19,20]，ならびにその他のO-11，O-87，O-88，O-129抗血清について行なつた．免疫血清は100° C，1時間加熱死菌免疫ウサギ血清である．凝集反応は，これら免疫血清の200倍稀釈液0.4ccに被検菌の1.5mg/cc浮遊液の100°C，1時間加熱菌液0.4ccを加え50°C，1夜放置した后肉眼により判定した．この400倍稀釈で凝集した株については，更に25,600倍迄の定量的凝集反応を行ないO抗原を決定した.

アミノ酸分解試験　生物学的性状により属名を決定し難いもの，あるいはその性状が典型的でないもので，*E. coli* O血清に凝集した株のいくつかについては，アミノ酸分解すなわちDicarboxylase試験をMøller[21]の法に準じて行なつた.

実験成績

学童大便についての実験成績　1955年7月都内某小学校2年生43名につき検便を行なつた．この内訳は男女ほぼ同数に近く年令の上では7～8才が大多数を占めていた．これらのうち下痢便は6例あつた.

Table 1. Strains from Stools of Children.

Children No.	Number of Strains	E. coli	Klebsiella	Cloaca	Citrobacter	Uniden-tified	Pathogenic E. coli	Note
1	4	4						
2	3	3					86 : 1 strain	Diarrhoea
3	4	3	1					
4	5	5						
5	5	5						
7	5	4	1					
9	6	5	1				44 : 1 strain	
10	6	6					26 : 1 strain	
11	7	5		2				Diarrhoea
12	3	3						
13	3	3						
14	5	3	1			1		
16	5	3			2			
17	7	2	3		2			
18	4	4						
19	3	3					44 : 1 strain	Diarrhoea
20	4	3	1					
21	6	5				1		
22	5	3	1	1			86 : 1 strain	
23	4	4						
24	6	6					127 : 1 strain	
25	5	3	1			1	127 : 1 strain	
26	4	4						
27	4	4						
28	7	7						
29	4	4						
30	6	4	1			1	44 : 1 strain	
31	5	5						
32	5	3		2				
33	5	4		1				Diarrhoea
35	4	4					44 : 1 strain	Diarrhoea
36	5	5						
37	5	5						
38	6	2		3		1		Diarrhoea
39	5	4		1			25 : 2 strain	
40	5	5						
41	6	5	1					
42	5	5						
43	6	4		1	1			
44	5	4			1		86 : 1 strain	
45	5	5						
46	8	7		1			86 : 1 strain 44 : 2 strain	
47	6	6					44 : 1 strain	

Table 2. Total of Strains from Stools of Children.

	Number fo Children	Number of Strains	E. coli	Klebsiella	Cloaca	Citrobacter	Uniden-tified
Asymptomatic	37	188	160	12	8	4	4
Diarrhoea	6	28	21	0	6	0	1
Total	43	216	181	12	14	4	5

分離株は第 1，2 表のとおりで総数 216株中 *Escherichia* 181 株（84%），*Klebsiella* 12株（6%），*Cloaca* 14株（6%）及び *Citrobacter* 4 株（2%）の他同定不能 5 株であり．*Salmonella*，*Shigella*，は検出されなかつた．*Klebsiella*は正常便に多く，*Cloaca*は下痢便に多いようであつた．*Citrobacter*は下痢便より証明されなかつた．

Table 3. Agglutinations Tests－Strains from Stools of Children in E. coli O sera.

Child No.	Strain No. \ O Sera	111	55	26	25	44	75	86	112	119	124	125	126	127	7	48	73	90	113	11	87	88	129
1	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,600	—
	6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	800	—
2	1	—	—	—	—	—	—	1,600	—	—	—	—	—	—	—	6,400	—	—	—	—	—	—	—
4	6	—	—	800	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3,200	—	—	—
	3	—	—	—	—	—	—	800	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	(400)	—	—	—	—	—	—	—
	7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	800	—	—	—
9	8	—	—	—	—	1,600	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10	1	—	—	—	(400)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	(400)	(400)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	(400)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	6	—	—	6,400	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
12	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	400
16	7	—	—	—	400	—	—	—	—	—	—	—	—	—	400	—	—	—	—	—	—	—	—
18	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	400	—	—	—	—	—	—	—
19	1	—	—	—	—	1,600	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	7	—	—	—	—	400	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
20	7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	800	—	800	—	—	—	—	—	—	—	—	—	400
22	6	—	—	—	—	—	—	3,200	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
24	1	—	—	—	800	—	—	—	—	—	400	—	800	400	3,200	—	—	—	—	—	—	—	1,600
25	7-2	—	—	—	800	3,200	—	—	—	—	1,600	—	1,600	1,600	—	—	—	—	1,600	—	—	—	6,400
26	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	800	—	—	—	—	—	—	—	—
	7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	800	—	—	—	—	—	—	—	—
30	2	—	—	—	400	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.600	—
	6	—	—	—	—	6,400	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.600	—
32	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	800	—
33	2	—	—	—	800	—	—	—	—	—	—	—	—	—	6,400	—	—	—	—	—	—	—	400
	6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	800	—	—	—	—	—	—	—	—
	7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	800	—	—	—	—	—	—	—	—
35	1	—	—	—	—	800	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	400
	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	800	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	6	—	—	—	—	800	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	7	—	—	—	—	1,600	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Child No.	Strain No. \ O sera	111	55	26	25	44	75	86	112	119	124	125	126	127	7	48	73	90	113	11	87	88	129
39	6	—	—	—	[6,400]	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	[1600]	—
	8	—	—	—	[12,800]	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	[1,600]	—
41	8	—	—	—	—	—	—	800	—	—	—	—	—	—	—	[3,200]	—	—	—	—	—	—	—
43	2	—	—	—	—	800	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
44	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	400
	2	—	—	—	400	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	—	—	—	[3,200]	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	400	—	—	—	—	—	—	—
45	2	—	—	—	—	—	—	800	—	—	—	—	—	—	—	[3,200]	—	—	—	—	—	—	—
46	1	—	—	—	400	[12,800]	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	400	—	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	—	—	400	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	—	—	—	800	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	7	—	—	—	400	[12,800]	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	800	—	—	—	—	—	400
	8	—	—	—	—	—	—	[1,600]	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	9	—	—	—	—	—	—	800	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
47	6	—	—	—	—	[6,400]	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

— : Absence of agglutination at 1 : 400.

□ : Difference between the agglutinations titer of these sera and endtiter of the strains from stools is within 2 tubes.

血清学的試験の成績は第３表に示した．被検216株中，前述の400倍稀釈*E. coli* O血清に凝集したものは51株で，その内訳は*E. coli* 48株，*Klebsiella*, *Cloaca*, 及び *Citrobacter* 各1株ずつであつた．それらのうち凝集価10,000倍以上の血清に1,600倍以上で凝集したもの及び，凝集価10,000倍以下の血清に，免疫に用いた菌と２管以内の差で凝集したものについて検討すると，2-1株は抗O-86血清及び抗O-48血清に夫々1,600及び6,400倍で凝集しているが，O-48菌は抗O-86血清に凝集するが，O-86菌は抗O-48血清に凝集しないとされている[16]ので，この株はO-48と決定してよいであろう．9-8株はO-44，10-6株はO-26，19-1株は44，22-6株はO-86と夫々決定された．24-1株は抗O-127，O-7，O-129血清に夫々400，3,200，1,600倍で凝集し，またO-25血清にも800倍で凝集しているが，O-7とO-25との間には，相互的類属凝集反応がある[16]との吉田の報告もあり，この株の正確なO抗原同定は，吸収試験にまたなければならない．25-7株は数種の血清に凝集しているが，この株は生物学的性状よりいつて*E. coli*でないので，この現象は非特異的なものとも考えられる．30-6及び35-7株はO-44である．39-6及び39-8株は抗O-25及びO-88血清に凝集しているが，凝集価からいつてO-25と決定してよいであろう．44-3及び46-8株はO-86で，46-1，46-7及び47-6株はO-44である．

非病原性*E. coli*としては1-2株：O-88；5-1株：O-11；30-2及び30-7株：O-88；33-2株：O-7；41-8及び45-2株：O-48と夫々同定された．

O抗原の決定された以上の株はすべて*E. coli*であつた．すなわち被検 *E. coli* 181株のうち３型菌はO-26が１株（0.6%）あり，病原性があるか，あるいはその疑がかけられているものとしてはO-25：２株（1.1%）；O-44：7株(3.9%)；O-86：３株(1.7%)で総計13株(7.2%)あり，被検学童43名よりの検出頻度としてはO-26：1名(2.3%)；O-25：１名（2.3%）；O-44：６名（14.0%）；O-86：３名(7.0%)となる．非病原性大腸菌としては O-7：1株（0.6%）；O-48：３株（1.7%）；O-11：１株（0.6%）；O-88：３株（1.7%）が同定された．

下痢患者大便についての実験成績　1955年秋，われわれの周囲に発生した下痢，発熱及び腹痛を主訴とする患者２名すなわち50才婦人及び３才女児の大便につき，検査した成績は第４，５表のとおりである．

Table 4. Strains from Stools of Diarrhoic Patients.

Patient No.	Number of Strains	E. coli	Klebsiella	Cloaca	Pathogenic E. coli	Note
51	6	2	3	1	—	Adult
52	6	6	—	—	1	Child

Table 5. Agglutinations Tests—Strains from Stools of Diarrhoic Patients in E. coli O Sera.

Patient No.	Strain No. \ O Sera	111	55	26	25	44	75	86	112	119	124	125	126	127	7	48	73	90	113	11	87	88	129
52	2	—	—	—	800	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3,200	—	—	—	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	—	—	—	800	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	4	—	—	—	1,600	—	—	—	—	800	—	—	—	800	—	—	—	—	—	1,600	—	—	—

— : Absence of agglutination at 1 : 400.

□ : Difference between the agglutinations titer of these sera and endtiter of the strains from stools is within 2 tubes.

成人患者便よりの株は6株中 *E. coli* 2株，*Klebsiella* 3株，*Cloaca* 1株で，いずれも実験に用いた *E. coli* O血清に凝集せず，幼児患者便よりの6株はいずれも *E. coli* で，そのうち3株は病原性があるか，その疑いがかけられている大腸菌の抗O血清に凝集したが，O抗原の決定されたものは，52-2株が非病原性のO-7と同定されたのみであり，52—4株はO—25，O—119，O—127，O—11の抗血清に凝集した．

その他の材料よりの株についての実験成績　食堂食器，豆腐食品，豆腐漬水，綜合食品，惣菜，日教販食中毒患者吐物，ウィールスによる実験的伝染性下痢症患者大便，健康成人大便より1955年夏，秋に分離した株のうち生物学的に同定不能のもの及び，同定できても典型的な性状を示さないもの34株について実験を行なつた．その成績は第6，7，8表に示すとおりでそれらの株のうち実験に供した *E. coli* O血清に凝集したものは *E. coli* 3株 *Citrobacter* 5株，同定不能11株であつたが，前述のようにこの際には原則として硫化水素産生菌のみを実験に供したので，ここに述べた各属の株数には意味は求められない．

Table 6. Agglutinations Tests—Strains from the Other Sources in E. coli O Sera.

Strain \ O Sera	111	55	26	25	44	75	86	112	119	124	125	126	127	7	48	73	90	113	11	87	88	129
R-209-2	—	—	—	—	800	—	—	—	—	400	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
T-7-1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	400	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,600
T-7-2	—	—	—	—	1,600	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
W-210-1	—	—	—	—	400	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
W-210-2	—	—	—	400	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	400	—	—	—
X-226	—	—	—	—	—	—	—	—	1,600	1,600	—	1,600	1,600	—	—	—	—	800	—	—	—	3,200
Y-4-1	—	—	—	12,800	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,600	—
日-2	—	—	—	—	3,200	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
日-4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	800	—
D-10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	400
D-18	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	400
D-19	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	400

O Sera / Strain	111	55	26	25	44	75	86	112	119	124	125	126	127	7	48	73	90	113	11	87	88	129
D-20	—	—	—	400	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
D-22	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	800
D-25	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1,600	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
D-32	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	400
山-16	—	—	—	—	800	3,200	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
山-20	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	800	—	—	—	—	—	400	—	—	—	—
山-22	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	400	—	—	—	—	—	—	—	—	—	800

— : Absence of agglutination at 1 : 400.

□ : Difference between the agglutinations titer of the sera and endtiter of strains from sources, described below, is within 2 tubes.

R : Vessels of restaurants. T : Tofu-food. W : Infusing-water of tofu.
X, Y : Foods. 日 : Vomitted matter from patients of food-poisoning at Nikkyohan.
D : Stools from volunteers of experimental infectious diarrhoea. 山 : Stools of a healthy adult.

Table 7. Biochemical Behaviour and Genera of Strains, Agglutinated in E. coli O Sera Tested.

	R 209-2	T 7-1	T 7-2	W 210-1	W 210-2	X 226	Y 4-1	日 2	日 4	D 10	D 18	D 19	D 20	D 22	D 25	D 32	山 16	山 20	山 22
Adonitol	—	—	—	—	—	—	—	$+_1$	$+_1$	—	—	—		—	—	—	—	—	—
Dulcitol	$+_1$	—	—	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_2$	—	—	$+_8$	$+_6$	$+_6$		$+_5$	$+_5$	$+_5$	$+_8$	$+_5$	$+_3$
Sorbitol	$+_1$	—	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$		$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$
Arabinose	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$		$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$
Xylose	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	—	—	—		—	—	—	$+_1$	$+_1$	$+_1$
Rhamnose	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_5$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$		$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$
Maltose	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$		$+_3$	$+_3$	$+_2$	$+_1$	$+_1$	$+_1$
Salicin	—	$+_1$	$+_1$	—	$+_2$	—	$+_2$	—	$+_3$	$+_2$	$+_2$	$+_4$		$+_2$	$+_2$	$+_3$	+	—	—
Inositol	—	—	$+_2$	—	—	—	—	$+_1$	—	—	—	—		—	—	—	—	—	—
Lactose	$+_1$	$+_1$	$+_4$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_5$	$+_1$	$+_1$	$+_1$		$+_1$	$+_1$	$+_1$	$+_2$	$+_1$	$+_1$
Sucrose	—	$+_2$	$+_1$	—	—	$+_2$	—	$+_1$	$+_1$	$+_5$	$+_5$	$+_3$		$+_3$	$+_2$	$+_7$	—	—	—
Mannitol	$\oplus_1$	$\oplus_1$	$\oplus_1$	$\oplus_1$	$\oplus_1$	$\oplus_1$	$\oplus_1$	$\oplus_1$	$\oplus_1$	$\oplus_1$	$\oplus_1$	$\oplus_1$		$\oplus_1$	$\oplus_1$	$\oplus_1$	$\oplus_1$	$\oplus_1$	$\oplus_1$
Glucose	$\oplus_1$	$\oplus_1$	$\oplus_1$	$\oplus_1$	$\oplus_1$	$\oplus_1$	$\oplus_1$	$\oplus_1$	$\oplus_1$	$\oplus_1$	$\oplus_1$	$\oplus_1$		$\oplus_1$	$\oplus_1$	$\oplus_1$	$\oplus_1$	$\oplus_1$	$\oplus_1$
Inulin	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		—		—	—	—	—
Starch	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		—	—	—	—	—	—
Indol	+	+	—	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H_2S	—	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+
Gelatin	—	—	—	—	—		—	—	—	—	—	—		—	—	—	—	—	—
Ammonium Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	$+_1$	$+_1$
Ammonium Citrate	—	$+_4$	$+_1$	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	$+_1$	—	—
KNO_3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	—	—	+	—	—	—	—	—	±	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—
Methyl-red	+	+	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—	+	—	—	—	+	+	+
Urea	+	—	++	—	—	—	—	±	—	—	—	—		—	—	—	—	±	—
KCN	±	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	±		+	+	+	+	+	+
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	—	+	+
Genera*	U	E	U	Ci	Ci	Ci	E	U	U	U	U	U	U	U	U	U	E	Ci	Ci

* E : E. coli, Ci : Citrobacter, U : Unidentified.

Table 8. Amino Acid Breakdown in the Strains, Agglutinated in E. coli O sera, Tested by Indicator.

Strain \ Amino Acid	Lysine	Arginine	Ornithine	Glutamic Acid 37°C	Glutamic Acid 25°C
X-226	$+_4$	$+_8$	$+_2$	+	+
W 210 1	$+_4$	$+_8$	−	+	+
W 210 2	$+_8$	$+_7$	$\times_7$	+	+
日-2	−	$+_8$	−	×	−
日-4	$+_7$	$+_8$	$+_1$	×	−
D-10	$+_8$	$+_7$	$\times_{10}$	+	+
D-18	$+_8$	$+_6$	−	+	+
D-19	$+_8$	$+_8$	$+_{10}$	+	+
D-22	$+_1$	$+_6$	$\times_9$	+	+
D-25	$+_8$	$+_6$	−	+	+
D-32	$+_1$	$+_6$	$+_6$	+	+
山-20	$+_8$	$+_6$	$+_8$	+	+
山-22	$+_8$	−	$+_4$	+	+

これらのうちO-111，O-55，O-26の３型菌血清に凝集したものはなかつた．病原性があるかあるいはその疑いがかけられている*E. cori* O血清に凝集したものについて検討すると，Y-4-1及び山-16株は夫々O-25，O-75と決定される．T-7-2株は生物学的性状により属名を決定できなかつたが，抗O-44血清に1,600倍で凝集した，X-226株は生物学的性状では *Citrobacter* であるが，数種の*E. coli* O血清に凝集し，アミノ酸分解試験では*E. coli*と判断されるので，吸収試験を行なわなければ判然したことは判らない．日-2株は抗O-44血清に3,200倍迄凝集したが，この株は生物学的に同定不能で，アミノ酸分解試験では*Citrobacter*に近い．D-25株は生物学的に同定不能であつたが，アミノ酸分解試験では*E. coli*に一致し，抗O-126血清に1,600倍迄凝集した．以上の他T-7-1株はO-129と決定された．第８表に記した菌株のうち上に述べなかつたものは，いずれも生物学的性状による属名の同定ができなかつたのであるが，実験に用いた*E. coli* O血清のいずれかに400〜800倍で凝集し，そのうち殆んどはアミノ酸分解試験において*E. coli*の性状を示した．

考　　察

学童大便についてのこの実験は，乳幼児の流行性あるいは散発性胃腸炎の原因となると公認され，あるいはその疑がかけられている特殊の大腸菌が，７〜８才の学童間にどのように分布し，あるいは検出されるかを知るためになされた．このような目的でなされた従来の実験報告をみると，中村[7]，福見ら[9]，小川ら[10]，高津ら[11]，鈴木[12]，栗原[14]及び所司[17]らはO-111，O-55，O-26がそれらによる下痢症患者と接触のない人の大便より検出されることは稀であるとした．われわれはこの実験において３型菌については，学童43名よりO-26を１株得たのみであつた．われわれのこの成績は上述の諸家の報告と一致するのみならず，O-26は健康乳児よりも，下痢のある乳児よりも検出され，O-111及びO-55と異なり下痢症状との関連が明らかでないとの小川ら[10]の報告とも一致する．

３型菌以外の，病原性があるか，あるいはその疑がかけられている大腸菌については鈴木[12]頭本ら[15]，吉田[16]らの健康成人大便よりの検出報告がある．われわれはそれらの大腸菌をかなりの頻度に，下痢のない学童大便中より検出し得た．従つて３型菌に比べればO-44，O-86，はそれ程健康人大便よりの検出が稀でなく，病原性が低いといい得よう．そしてO-44の検出頻度が高かつた事は，被検対象の学童が日常生活を共にしている一群であつたことと関連づけて解釈したい．

今回の実験の途中，偶然われわれの周囲に発生した下痢患者よりは，病原性があるかあるいはその疑のかけられている大腸菌は，検出されなかつた．この下痢は流行性でなかつた．

その他の材料として一括したもののうち，食品関係の検体総数は約2,500件で，そのうちの５件よりの菌につき凝集反応を行なつてO-44及びO-25が夫々１株ずつ決定された．この実験では前述のように硫化水素陰性菌は原則

として実験の対象とせず，また凝集反応を行なつたものは，そのなかでも生物学的に同定不能，あるいは非典型的な株であつたから，この検出頻度は必ずしも低いとはいえないであろう．

健康成人の検便は1名につき21日間に7日行ない，今回の実験では生物学的性状よりいつて*E. coli*に入れたが，その性状が典型的でないもののうち1株がO-75と同定された．従つてこれも検出頻度は低いとはいえない．

日教販食中毒患者吐物，及び実験的伝染性下痢症患者のウィールス服用後5日前後の水様便より分離され，夫々O-44及びO-126血清に凝集した菌は，アミノ酸分解試験の成績より考えて，*E. coli*の非典型的なものと判断してよいであろう．なお日教販食中毒は1955年10月に発生して，原因はブドウ球菌とされたものである．

以上の*E. coli* O血清に凝集した株のうち日-4，山-22の2株は夫々Bethesda-Ballerup Group O抗原6．4b，5b及び12a，12cを有することをわれわれはさきに認めた[18]が，この事実については，更に検討が必要であろうわれわれの行なつた実験では，実験に供した*E. coli* O血清に凝集した77株のうち，22株が2種以上の血清に凝集した．これらの正しい解釈は吸収試験にまたなければならないが，*E. coli* O抗原について標準株あるいは試験株を用いてなされたこれまでの諸家の実験報告[16,19,20]と比べてみると，われわれの実験結果には，諸家の報告と一致する点もあるが，しない点もある．一致した成績としてはO-86とO-48，O-25とO-7，O-44とO-73の間の類属凝集が挙げられる．

結論

学童大便，散発性下痢患者大便よりの*E. coli*, *Klebsiella*, *Cloaca*及び*Citrobacter*ならびに，健康成人大便，食品関係，日教販食中毒患者吐物，実験的伝染性下痢症患者下痢便よりの同定不能株あるいは，非典型的な*E. coli*, *Citrobacter*について，病原性大腸菌あるいは，その疑いのあるとされている*E. coli* O血清及び，それらとO抗原において関係があるとされた*E. coli* O血清による凝集反応を実施し次の結論を得た．

1) 都内某小学校2年生43名よりの*E. coli* 181株よりO-26：1株；O-25：2株；O-44：7株；O-86：3株；を得た．被検43名よりの検出頻度としてはO-26：1名（2.3%）；O-25：1名（2.3%）；O-44：6名（14.0%）；O-86：3名（7.0%）となる．

2) 2名の散発性下痢患者よりは病原性大腸菌，あるいはその疑がかけられている大腸菌と同定し得る菌は得られなかつた．

3) 食品関係，食中毒患者吐物，ウィールスによる実験的伝染性下痢症患者下痢便健康成人大便より分離され生物学的に同定されないか，あるいは同定されてもその性状が典型的でない34株のうち，O-25：1株；O-44：2株；O-75：1株；O-126：1株が当該O抗原として決定された．そして実験に供したO血清に凝集したもののうち，2株は，Bethesda-Ballerup Group O抗原とさきに決定されたものであつた．

4) *E. coli*標準株及び試験株を用いた諸家の実験報告において，抗原関係があるとされたもののうち，O-48とO-86，O-7とO-25及びO-44とO-73の関係は，われわれの実験においても肯定された．

御指導，御援助をいただいた日本医大八田教授，国立衛試岩原部長に御礼申上げると共に，血清を分与された国立衛試林技官に謝意を表する．

文献

1) Kauffmann, F.：Enterobacteriaceae. 2nd Ed. Munksgaard, Copenhagen, (1954)；*J. Immunol.* 57：71 (1947).

2) 広木：文部省腸内細菌研究班会議報告（1954）；北里メディカルニュース，14：1（1955）；第29回日本細菌学会総会特別講演，熊本（1956）.

3) 小張：日伝染会誌．29：52－66（1955）；30：553－560（1956）.

4) 福見：日伝染会誌．30：545－552（1956）.

5) 小川：日伝染会誌．30：561－569（1956）.

6) 村田，本間：日伝染会誌．30：570－578（1956）.

7) 中村：日本医師会誌．36：340－350（1956）；日伝染会誌．30：579－592（1956）.

8) 坂崎，他：日本公衆衛生雑誌，3：(9)，（1956）；腸内細菌検索法，納谷書店，東京．（1956）.

9) 福見，他：日本医事新報，1457：1025 (1952).
10) 小川，他：日本臨床，11：901 (1953)；日細菌学誌．8：621—625 (1953).
11) 高津，他：小児科診療，6：71 (1953).
12) 鈴木：日伝染会誌．28：541—544 (1954).
13) 園田，田中：日衛生学誌．10：66—66 (1955).
14) 栗原：日小児会誌．59：355 (1955).
15) 頭本，佐藤，安斎：第30回日本伝染病学会講演，福岡 (1956).
16) 吉田：日伝染会誌．30：118—127，688—696，697—704 (1956).
17) 所司：日伝染会誌．30：974—993 (1956).
18) 山地，田中，志波，石関，八田：衛生試報．74：446—446 (1956).
19) ϕrskov, F. : *Acta Path. et Microb. Scand.* 31 : 1 (1952).
20) Ewing, W. H., Hucks, M. C. and Taylor, M. W. : *J. Bact.* 63 : 319—325 (1952).
21) Mϕller, V. : Acta Path. et Microb. Scand. 34 ; 158—172 (1954).

Summary

Agglutinations tests were performed with following strains in anti-O sera of *E. coli* which had been recognized to be pathogenic or doubted to be pathogenic, that is O-111, O-55, O-26, O-25, O-44, O-75, O-86, O-112, O-119, O-124, O-125, O-126, and O-127. Strains tested were, (1) *E. coli*, *Klebsiella*, *Cloaca* and *Citrobacter* from stools of school-children in Tokyo and of diarrhoic patients ; (2) unidentified strains, and *E. coli* as well as *Citrobacter* which had not typical biological characters, isolated from materials related to foods, stools of a healthy adult, vomitted material of a food poisoning and diarrhoic stools from volunteers of an experimental Infectious Diarrhoea due to a virus strain.

The results are shown as below

1) One hundred and eighty one strains of *E. coli*, that is isolated from stools of 43 school-children of the second-year grade of a primary school in Tokyo, included *E. coli* O-26 1 strain, O-25 2 strains, O-44 7 strains, O-86 3 strains. Thus the rate of isolation of these strains in the 43 children is *E. coli* O-26 1 child (2.3%), O-25 1 child (2.3%), O-44 6 children (14.0%), and O-86 3 children (7.0%).

2) No strain from stools of 2 diarrhoic patients could not be confirmed to be *E. coli* which had been recognized to be pathogenic or to be doubted of the pathogenicity.

3) *E. coli* O-25 1 strain, O-44 2 strains, O-75 1 strain and O-126 1 strain were determined in 34 strains including unidentified strains, and *E. coli* as well as *Citrobacter* whose biological characters were not typical, isolated from materials related to foods, stools of a healthy adult, vomitted material of a food poisoning, and diarrhoic stools of volunteers infected with a virus of Infectious Diarrhoea.

Two strains from these materials, which were agglutinated in *E. coli* O sera used in our experiment, had been determined to be O antigen of Bethesda-Ballerup group in our recent work.

4) Antigenic relationships between O-48 and O-86, O-7 and O-25, as well as O-44 and O-73, reported by other authors, were confirmed in this study.

Received June 18, 1957.

ブドウ球菌性食中毒由来株に関する研究
特に供試株の Phage typingについて

鈴木　昭，林　冨子，河西　勉

Studies on the Phage Typing of *Staphylococci* from Food-poisoning.

Akira Suzuki, Tomico Hayashi, and Tutomu Kawanishi

まえがき　牛乳由来ブドウ球菌に関する研究第5報に詳細に述べた如く[2]，ブドウ球菌（以下ブ菌）の分類に最近 Bacterio phageによる方法が採用されるようになり，我が国においてもこの問題に関する研究会が組織され私達もその一員として主として食品衛生に関するブ菌の phage typeの分布状態を調査することを分担し，先ずブ菌性食中毒由来株のphage typeについて検討しその結果，若干の知見を得たので報告する．

実験方法

供試株，供試株は各都道府県にお願いして各地に発生したブ菌性食中毒例より分離した菌株の送付を受け既に当研究室の保存株として氷室に保存していた菌株[1]と，最近東京．滋賀．香川の各県より送付を受けた菌株と，それに加えて，私達の直接取扱つた長野県における1例より分離した菌株等23例107株について生物学的性状及び phage typeとそれに加えて抗生物質に対する態度について実験を行なつた．

食中毒例			23例
供試菌株数			107株
黄色株		95株	Coagulase＋92株
			Coagulase－3株
白色株		12株	Coagulase＋4株
			Coagulase－8株
レモン株		0	
Coagulase	＋	96株	黄色 92
			白色 4
	－	11株	黄色 3
			白色 8

供試 phage 供試 phage は予研より分与を受けた20種の標準 phage 原液を当研究室で増殖し検定の結果，その原液と同一であることを確認し[2]，型の如くRoutin test Dilution（R. T. D.）を調べて分類に使用した．

生物学的性状及び抗生物質に対する態度に関する検査法は前報[1]に準じた．

実験結果

供試株の生物学的性状の検査の結果は 107 株中，黄色株95株（88.8%），白色株 12株（11.2%），レモン株0株（0%）で，そのうち Coagulase 陽性株は96株（89.7%），Coagulase 陰性株は11株（10.3%）であつた．そして phage type の分類に供試したものは Coagulase 陽性株の96株である．

1）食中毒由来株のphage typeによる分類

供試株のphage typeによる分類成績は第1表に示す．

第1表　食中毒由来株のファージ型による分類

菌株名	供試株数	型別可能菌株数 R.T.D ×100	R.T.D ×10	R.T.D ×1	ファージ型Ⅲ群 R.T.D ×100	R.T.D ×10	R.T.D ×1
東京	11	11	10	8	11	10	8
埼玉	3	0	0	0			
目黒	2	0	0	0			
篠	1	1	1	0	1	1	
神C	1	1	1	0	1	1	
食	4	1	0	0	1		
深川	1	1	1	1	1	1	1
マヨ	1	1	1	1	1	1	1
調	1	1	1	0	1	1	
群マ	9	5	4	0	5	4	
松山	3	3	3	3	3	3	3
岡田	2	0	0	0			
浅草	6	6	6	6	6	6	6
G 2	3	3	2	0	3	2	
G 4	2	0	0	0			
宮崎	1	1	1	1	1	1	1
札幌	1	1	1	0	1	1	
帯広	1	1	1	1	1	1	1
香川	5	4	1	0	4	1	
栃木	1	1	0	0	1		
長野	22	2	1	0	2	1	
長浜	3	1	1	0	1	1	
長崎	12	1	0	0	1		
計	96	46 (47.9%)	36 (37.5%)	21 (21.8%)	46	36	21

即ち供試株96株のphageに対する態度を検べるに際し，先ず phage 原液をそれぞれ, R. T. D. × 1, R. T. D. ×10, R. T. D. ×100の各々三段階に濃度を調製して,各々について態度をみるとすべて phage に対して感受性のある菌株はphage Type GroupⅢに属するもので，Group Ⅰ. Ⅱ. Ⅳ その他等は全然認められなかつた．型別可能株の百分率は，phageの各濃度により異なり，R. T. D. × 1では21株(21.8%)，R. T. D. ×10では36株(37.5%)R. T. D. ×100では46株 (47.9%) がそれぞれ型別可能であつた．

2) 供試株の溶菌域の変化

ブ菌の phage に対する態度について調べてみると，時には phageに対する感受性 (溶菌域) の相違が認められる場合がある．そこで各phage液の各濃度による相違を前述の三段階で検べた．その成績は第2表に示す．

第2表　溶　菌　域　の　変　化

	菌株名	R. T. D ×100	×10	×1
全く溶菌域の変らないもの	東　4	53	53	53
	〃　7	53	53	53
	浅も　1	53	53	53
	〃　2	53	53	53
	〃　3	53	53	53
	浅も吐 1	53	53	53
	〃　2	53	55	53
	〃　3	53	53	53
各濃度に溶菌域が認められるも一部に変化の認められるもの	東　5	47/54/53	53	54/53
	〃　6	47/54/53	53	53
	〃　9	47/54/53	53	53+
	〃　10	53	53	53+
	〃　11	53	53	53+
	〃　12	53	53	53+
	深　川	7	7	7/9
	マ　ヨ	6/7/47/54/75,	6/7/47/54/75,	6/7/47/75
	松山　18	47/75/53	47/75/53	53
	〃　19	54/53	54/53	53
	〃　20	54/53	54/53	53
	宮　崎	6/7/47/54/53,	6/54/53,	6/54/53
	帯　広	7/47/54	7/47	7

	菌株名	R. T. D ×100	×10	×1
R.T.D ×100. ×10. のみに溶菌域が認められ一部に変化の認められるもの	浚　吐	54+	54	—
	前パン	73/53	53	—
	G_2　C_1	7/47/54	54	—
	〃　C_2	7/47/54	54	—
	札　幌	54/53	53	—
	長野 17	7/47	47	—
	長　浜	7/47/54	47	—
	生品あは	47/53	53	—
	香川2—1	7/47	7/49	—
	東　1	7/47/54	54	—
	〃　2	7/47/54	47/54	—
	篠　1	47/54/53,	6/7/73/47/54/53,	—
	神　C	47/54/53,	47/54/53,	—
	調　布	7	7	—
	群　3	54	73/47/54,	—
R.T.D ×100. にのみ溶菌域が認められるもの	東　3	7/54	—	—
	食　1	7/54/53	—	—
	群　4	73/47	—	—
	〃　7	47/54	—	—
	G_2　C_8	54	—	—
	香川1—1	6/7/47	—	—
	〃　1—2	47	—	—
	香川たら1	47	—	—
	長野　1	47/54	—	—
	トチギ	7	—	—
	長崎　12	42E/7/47	—	—

即ち溶菌域が各濃度とも全く変化の認められないものは96株中８株（8.3%）一部に変化は認められるが，各濃度とも溶菌域の認められるものは13株（13.5%）であつた．又R. T.D.×100及びR. T. D.×10にのみ溶菌域が認められしかも一部に変化の認められるものは15株（15.6%）であつた．同様にR. T. D.×100 にのみ溶菌域の認められるものは11株（12.5%）であつた．

3）各溶菌域の出現頻度

食中毒由来株の場合どのようなphage patternが一番多く認められるかを検べた．その成績は第３表に示す．

第3表　各溶菌域の出現頻度

溶菌域	R. T. D.×1 *	R. T. D.×10 *	R. T. D.×100 *
53	16 (76.2) %	18 (50) %	11 (23.9)%
47/54/53	0	2 (5.6)	6 (13)
7	1 (4.8)	2 (5.6)	4 (8.7)
54	0	4 (11.1)	3 (6.5)
7/47/54	0	0	6 (13)
54/53	1 (4.8)	1 (2.8)	3 (6.5)
47	0	2 (5.6)	2 (4.3)
7/47	1 (4.8)	2 (5.6)	2 (4.3)
47/54	0	1 (2.8)	2 (4.3)
6/7/47/54/75	0	1 (2.8)	1 (2.2)
6/7/47/54/53	0	1 (2.8)	1 (2.2)
6/7/47	1 (4.8)	0	1 (2.2)
6/53	1 (4.8)	0	0
6/54/75	0	1 (2.8)	0
73/47/54	0	1 (2.8)	0
7/54	0	0	1 (2.2)
73/47	0	0	1 (2.2)
47/53	0	0	1 (2.2)
73/53	0	0	1 (2.2)
7/54/53	0	0	1 (2.2)
計	21	36	46

＊　型別可能菌数に対する％

即ち各濃度ともphage pattern 53が最も多く認められR. T. D.×1では76.2％，R. T. D.×10では50.0％，R. T. D.×100では23.9％であつた．次いで7，54，47，6，75の順でこれらが単独又は2～3混合で認められた．

4）原因食と吐物との関係

ブ菌の分類にphageが採用され，その中で最も重要な点はその菌株の汚染源，又は感染源等が求心的に追求出来る点にある．そこで原因食由来株とその患者の吐物由来株との関係をphage typeで2例について検べてみた．その成績は第4表（その1）（その2）に示す．

第1例　東京都内で発生した浅草における餅だんごによる例である．参考までに厚生省における疫学的調査の結果を記載する．

疫学的調査結果　発生年月日，昭和31年4月24日，患者数，33名，摂食者，79名，発病率，42％，原因食，餅だんご，病因物質，ブドウ球毒素．

症　状　潜伏時間，3～4時間，悪心，嘔吐（10回以上），下痢（水様性，5～6回），上腹部痛（胃部痛）

原因食の調査　昭和31年4月24日午前3時頃足立区の某所で，米粉で白だんご，及びよもぎだんごを作り（患者9名），これをそこの家人が親戚の浅草某所に，持参同日夕刻親戚の者及びその隣人，友人その他とこれに主に黄粉をつけて食べた．（患者24名）種々調査の結果，黄粉をつけないで食べた者，及び白だんごを食べた者，それぞれから患者が認められ，だんごを食べなかつた者からは患者の認められないところから原因食は餅だんごであると断定した．なお製造から長時間経て食べた者ほど症状は重かつた．しかしその原因食の汚染経路は不明である．

第4表　原因食と吐物との関係（その1）

原因食				吐物			
浅草もち（だんご）				浅草もちだんご＋その他胃内容物			
菌株名	生物学的性状 M (C.N.H)	溶菌域	ファージ群	菌株名	生物学的性状 M (C.N.H)	溶菌域	ファージ群
浅も 1	＋（＋＋＋）	53	Ⅲ	浅も吐1	＋（＋＋＋）	53	Ⅲ
〃 2	＋（＋＋＋）	53	Ⅲ	〃 2	＋（＋＋＋）	53	Ⅲ
〃 3	＋（＋＋＋）	53	Ⅲ	〃 3	＋（＋＋＋）	53	Ⅲ

原因食と吐物からそれぞれ分離したおのおの3株ずつについて生物学的性状とphage typeを検べると生物学的性状は共にM（C. N. H）system完全型でphage GroupⅢに属するphage pattern53によるもので全く同一の菌株であることがわかつた．

第2例　滋賀県長浜においてハンペンにより発生した1例である．その疫学的調査結果を第1例同様記載する．

疫学的調査結果

発生年月日，昭和31年8月7日，患者数，128名（男125，女3）発病率，68％，原因食ハンペン，病因物質，ブドウ球菌毒素．

症　状　潜伏時間，3～4時間まで96名，8時間まで31名，8時間以上1名．

嘔吐59％（最高17回），下痢水様性最高16回，腹部痛50％，発熱23％，悪心7％，倦怠感31％，臥床40％，けいれん0.5％，脱力感9％，裏急後重11％，麻痺2％，眼症状0％．

原因食の調査

マスターテーブルの作成等により種々調査の結果事件当日の夕食に供したハンペンが原因である事が判明した．これは購入後何の加熱調理もせずそのまま約7時間後に食膳に供している．このハンペンはいわゆる「カツギヤ」の手を経て購入されたもので取扱，その他は全く不備であつたが，そのハンペンの汚染経路は全く不明である．

第4表　原因食と吐物との関係（その2）

原因食				吐物			
ハンペン＋鰭フライ				ハンペン＋鰭フライ＋その他胃内容物			
菌株名	生物学的性状 M (C.N.H)	溶菌域	ファージ群	菌株名	生物学的性状 M (C.N.H)	溶菌域	ファージ群
長浜 4	＋（－－－）	(－)	－				
〃 12	＋（＋＋＋）	(7/47)	(Ⅲ)	長浜 17	＋（＋＋＋）	7/47	Ⅲ
〃 13	＋（＋＋＋）	(7/47)	(Ⅲ)				

原因食ハンペンより分離した3株と吐物より分離した1株の関係を検べると，前者は生物学的性状のM（C. N. H）system完全型2株と，不完全型1株で，いずれもphageに対する感受性は認められなかつた．それに反し後者は生物学的性状のM（C. N. H）system完全型でphage GroupⅢに属するphage pattern7/47に感受性のある菌株であることがわかつた．そこで標準phageに対して同一の態度を示さないので，はたして前者と後者が同一菌であるという判定がつけ難いので，後者の菌株に認められたphage pattern7/47そのもののphageを増殖し原液として再度，phage patternを検べると，そのphage pattern7/47によつて溶菌されることが前者，後者共認められ，同一菌株であることが想像できる．

5）調理材料と原因食との関係

香川県に発生した1例で既に県当局により疫学的調査の結果，原因食を調製したその材料に原因があることが

判明し，調理材料と原因食からそれぞれ2株ずつ分離したものを送付をうけた．その中毒例の疫学的調査結果は次の通りである．

疫学的調査結果

発生年月日 昭和31年6月29日，患者数950名（学童934名，教師16名）発病率72.4%，原因食 給食用すのもの，病因物質ブドウ球菌毒素

症　状　潜伏時間3～4時間まで421名，4～10時間まで287名，不明241名，嘔吐67%，（2～3回最高11回）下痢79.4%（2～3回最高11回），腹痛74%，発熱51%．頭痛31%，悪心7%，倦怠感32%，臥床26%，けいれん2%，眼症状0%．

原因食の調査

種々調査の結果，給食に用いたすのものが原因である事が判明した．更に求心的に調査を進めると，そのすのものの材料に用いたタラがブ菌に汚染している事が判明し，その残品を細菌検査の結果，原因食と同一の生物学的性状を示すブ菌を検出した．人手，調製，その他の時間的経過からみて，調理材料中のタラが原因である事がいえるがその汚染経路は全く不明である．

調理材料由来株2株，原因食由来株4株のM（C. N. H）systemを検べると前者は完全型1株，不完全型1株で，後者は全株とも完全型であつた．

phage typeはGroup Ⅲに属するものでphage47による共通溶菌域をもつ同一菌株によるものであることが想像出来る．その成績は第5表に示す．

第5表　調理材料と原因食との関係

		菌株名	生物学的性状 M（C. N. H）	溶菌域	ファージ群	ペニシリン耐性
調理材料	タラ	香川タラ　1	＋（＋　＋　＋）	47	Ⅲ	100 u/cc
		〃　2	＋（－　－　±）	－	－	10 u/cc
原因食	タラ ワカメ のすもの	香川1 1.	＋（＋　＋　＋）	6/7/47	Ⅲ	50. u/cc
		香川1 2.	＋（＋　＋　＋）	47	Ⅲ	100. u/cc
		〃　2 1.	＋（＋　＋　＋）	7/47	Ⅲ	100. u/cc
		〃　2 2.	＋（＋　＋　＋）	－	－	100. u/cc

6）　**私達が直接取扱つた食中毒例**

長野県に発生したとりのこ餅（すあま）による1例であるが，これは或る業者が，その中毒検体を細菌検査のため依頼試験品として当所に差出したものである．

疫学的調査結果

発生年月日　昭和31年9月1日，患者数52名，摂食者72名，発病率72.2%，原因食すあま餅，病因物質ブドウ球菌毒素．

症　状　潜伏時間　3～4時間まで22名，4～10時間まで30名，嘔吐57.7%（2～4回最高20回），下痢73%（3～4回最高12回），腹痛92.3%，発熱0.96%，頭痛38.4%，悪心11%，倦怠感48%，臥床36.5%，けいれん11.5%眼症状0%．

原因食の調査

某所においてそこの主人病気全快祝のため菓子製造業者にすあま餅をつくらせ，それを全快祝に出席した全員におくる。種々調査の結果すあま餅摂食者のみに患者の発生をみているところからこれによるものと断定した．この菓子製造業者は以前から食品衛生上，環境衛生上不備の点が多く，度々当局より注意されていたにかかわらず．何ら改良せず，食品衛生法による製造禁止の処分をうけた．原因食は製造後約12時間後に全快祝会場に納入されたもので摂食者は早いものは納入後約30分，遅いものは約13時間で食べている．そしてこの遅いものほど患者の発生を多くみている．原因食のブ菌による汚染経路は全く不明である．

検体の細菌学的検査

まず当所に差出された検体を食品衛生検査指針に従つて細菌検査を行なつた結果，腸内細菌等による食中毒原因菌と思われるものは認められず，ブ菌が70万～1億で純培養状に検出された．赤．白2個の検体からそれぞれ15株ずつ分離して，その生物学的性状のうち M(C. N. H) system と phage type，ペニシリンに対する態度について検べた．その結果は第6表に示す．

第6表　私達が直接取扱つた食中毒例

原因食	ブ菌数	分離菌株数	生物学的性状 M (C. N. H)	ペニシリン耐性 u/cc 100	u/cc 50	u/cc 10	u/cc 1	u/cc 0.50	ファージ感受性 ＋	−	溶菌域
すあま赤	10×10^6	10	＋(＋ ＋ ＋)	3	4	2		1	1	9	47/54
		0	＋(＋ ＋ −)								
		1	＋(＋ − −)					1		1	−
		3	＋(− − −)					3		3	−
		1	−(− − −)				1			1	−
すあま白	7×10^6	10	＋(＋ ＋ ＋)	2	6	2			1	9	7/47
		1	＋(＋ ＋ −)	1						1	−
		0	＋(＋ − −)								
		3	＋(− − −)					3		3	−
		1	−(− − −)					1		1	−

即ち赤検体より分離した15株中 M(C. N. H) system 完全型10株，不完全型5株で，ペニシリンに対する態度は完全型10株中9株（90%）は10u/cc以上の耐性菌であつた．これに反し不完全型5株中4株は0.5u/cc以下の感受性株であつた．phage に対する感受性は完全型に1株認められ，Group Ⅲ に属する phage 47/54 であつた．他の菌株はすべてphageに対する感受性は陰性であつた．白検体より分離した15株についても赤検体由来株と全く同様であつた．

7） phage感受性とペニシリン耐性との関係[3]

phage 感受性とペニシリン耐性との関係は第7表に示す．

第7表　ファージ感受性とペニシリン耐性

	ペ感受性 / ファージ濃度	感受性株（%）	耐性株（%）
型別可能	R. T. D×1	1 (4.8)	20 (95.2)
	R. T. D×10	1 (2.8)	35 (97.2)
	R. T. D×100	3 (6.6)	43 (93.4)
型別不能	R. T. D×1	22 (29.4)	53 (70.6)
	R. T. D×10	19 (31.7)	41 (68.3)
	R. T. D×100	17 (34)	33 (66)

即ち型別可能株ではphageのR. T. D×1 R. T. D×10，R. T. D×100，の各濃度がそれぞれ95.2%，97.2% 93.4% が耐性株であつた．これに反し型別不能株においては耐性株がそれぞれ 70.6%，68.3%，66%を占めていた．

8） ペニシリンに対する後天的抵抗性とphage typeとの関係[4]

ペニシリンに対する後天的抵抗性とphage typeとの関係は第8表に示す．

第8表　ペニシリンに対する後天的抵抗性とphage patternとの関係

菌株名	人為的に耐性をつける前		人為的に耐性をつけた後		耐性復帰後	
	PC単位 u/cc	ファージ溶菌域	PC単位 u/cc	ファージ溶菌域	PC単位 u/cc	ファージ溶菌域
群 5	<0.1	—	0.5	—	0.1	—
埼 84	<0.1	—	1	—	0.5	—
目 3	<0.1	—	1	—	0.1	—
食 I	<0.1	—	0.5	—	0.1	—
食 II	<0.1	—	0.5	—	0.1	—
G 4	<0.1	—	0.5	—	0.1	—
岡田	0.1	—	0.5	—	0.1	—
東 10	1	53	10	54/53	5	53
長浜 12	1	—	10	—	1	—
群 I	5	—	50	—	10	—
調布	5	7/47	100	42E/7/47	20	7/6/47
深川	10	7/47	50	7/47/54	10	7/47
渋吐	20	54	500	54/75	100	54
東 I	50	7/47 /54	500	7/47/54	50	7/47/54
群 4	50	73/47	500	73/47	100	73/47
長野 2	50	—	500	—	50	—
長野 18	50	—	100	—	50	—
札幌	100	54/53	500		100	54/53
浅も I	100	53	500		100	53
前パン	100	73/53	500		100	6/73/53
目 I	100	—	500	—	100	—
香川 2.2	100	—	500	—	100	—

即ち供試株として感受性で型別不能株7株と耐性株で型別可能9株と型別不能株6株のそれぞれ計22株を選んでペニシリンの後天的耐性による phage pattern の変化をみた．その成績は表に示す如く phage paffern の変化から型別不能株が型別可能株に変化したものはなかつた．又型別可能株で溶菌域の変化したものも1，2の例外を除いては大体ない．又 phage Group が全く変つた例も認められなかつた．後天的耐性株を再び復帰させても全く同様であつた．

考察及び結論

私達はブ菌性食中毒由来菌23例107菌の生物学的性状の検査とphage typingを行ない次の如く考察し結論した。

1）生物学的性状のうちいわゆるM（C．N．H）systemを取上げて，エンテロトキシン産生能の鑑別法としての価値を再度追求した結果[1,2] 前報同様よく M(C．N．H) system 完全型にその中毒原因可能株が認められ．不完全型には全然認められず，従来から私達が主張して来たスクリーニングテストとしての価値を再確認出来た．しかし送付された菌株のなかには，いわゆる不完全型に属し，エンテロトキシン産生能も認められず，中毒原因菌としての可能性が疑わしいものもある．この点については尚今後本質的な問題と関連して研究されるべき問題の一つである．

しかし直接中毒例を取扱う場合，特に原因菌の検索分離等は充分な注意が肝要で，節格中毒原因菌をみつけながら釣菌出来ず逃がしてしまうような事も考えられるので，その分離方法，培地．培養．検体量等も吟味すべきである．

2) phageに対して感受性の認められる菌株は幾多の報告[2,5,8]同様Coagulose陽性株で陰性株には全然認められない。

3) 食中毒由来株でCoagulose 陽性株についてのphage typeの分布状態はGroup Ⅲ のみで Williams[6] らの成績とよく似ている．phage液の各濃度によりその百分率が異なり R. T. D×1000 で47.9%，R. T. D×100で37.5% R. T. D×10で21.8%である．このようにR. T. D×100 のように相当濃厚な phage 液を用いても約 50%近くの菌株しか分類出来ない点はこのphage typingが如何に優秀な方法であつても未だ100%の価値を発揮することは困難である．しかし供試した20種以外に新しい phage を探し出して追加することにより或る程度解決出来るであろう．

4) 溶菌域の phage 液のR. T. Dの各濃度による差異は全然認められないものもあるが一般的に濃度の濃厚なものほど溶菌域が広くなる傾向がある．

5) 食中毒由来株の場合多く認められる phage pattern は 53. 7. 54. 47. 6. 75等である．

6) 原因食由来株とその患者の吐物由来株のphage pattern又は調理材料と原因食の phage patternを検べると全く同一のphage pattern を示す例と若干異なるphage pattern を示す例とがあるが，後者の場合再度分離phageを原液としてphage patternをみれば大体同一の態度を取る場合が多い．この事から従来の生物学的性状のみによつて判定していた事からすれば正に劃期的な方法といえる． しかし原因菌分離の際，種々疫学的調査の結果．関係があると思われる食品，材料，従業員，環境等から菌の分離を試みておれば，このphage typing の真の目的たる汚染源の追求を細菌学的に確実に求めることが出来たであろう事を考え合わせると，菌分離は充分な注意と菌分離の場を広く求めることが大切である．

7) 私達が直接取扱つたとりのこ餅による中毒例において30株の菌株を分離したが，そのうち完全型 20株，不完全型 10 株が検出された。この事から選択培地[2]の重要性が痛感される．また赤，白各検体より検出された菌株は phage type により同一汚染によるものである．

8) 供試株のphage感受性とペニシリン耐性[2]は第５報と大体同様の傾向を示している．特に型別可能株においては耐性株が約95%を占めている．これに反し型別不能株においては約30%が感受性である．

9) ペニシリンに対する後天的抵抗性とphage typeとの関係は特に Group Ⅲ においては抵抗性の増加にともなつて phage typeの変化[4]は認められず復帰後においても同様である．

この稿を終るに当り試料及び菌株を提供して下さつた厚生省食品衛生課及び東京，香川，滋賀各県衛生部に感謝の意を表します．

文　　献

1) 八田貞義．鈴木昭，林富子，西田正道：食品衛生研究，5，1−9 (1955).

2) 鈴木昭：衛生試験所報告，74，317−330 (1956).

3) Segalove. M., : *J. Inf. D.*, 81, 97−111 (1947).

4) Gould. J. C., : *nature* 176, 176 (1955).

5) 福見秀雄：臨床病理 特集g，166−176 (1955).

6) Williams. R. E. D., Rippon, J. E., and Dowsett. L. M., : *Lanat* i 510 (1953).

7) John. E. B. and Miriam. C., : *J. Inf. Dis.* 92(2)1−13 (1953).

8) Jackson. G. G, Dowling. H. F. and Lepper. M. H., : *J. Lab. Chin. Med.*, 44(1)14−50 (1953).

Summary

Biological characters and phage types of 96 strains of staphylococci isolated from Food-poisoning were tested.

1) They were classified into complete type of M(C. N. H)system and produced Enterotoxic substance.

2) About 50% of all strain were phage-typable and all belonged to group Ⅲ.

Received June 18, 1957.

90％石炭酸による細菌内毒素の抽出

岩 原 繁 雄, 大 淵 令 子

Extraction of Bacterial Endotoxin by 90％ Phenol.

Shigeo IWAHARA and Reiko OFUCHI

まえがき 内毒素の化学的抽出法としてはトリクロル醋酸，チエチレングリコール，ピリヂン等を用いる方法がよく知られているが，醋酸，石炭酸，尿素，プロピレングリコール等による抽出法も考案されており，それぞれ特色を持つている．これらの諸方法のうちPalmer等[1]によつて報告された88～95％の濃厚石炭酸を用いる抽出法は比較的新らしい方法で，Morgan等[2]によつて検討されたほか，我が国においても秋葉，根津，水野等によつて百日咳菌，結核菌，Candida菌等の多糖類抗原の抽出が行われよい成績がえられている．

我々は赤痢菌，サルモネラ菌，大腸菌等の内毒素を90％石炭酸を用いて抽出を行い比較的夾雑物の少ない内毒素を得ることができ，粗毒素のままで発熱性，毒性，抗原性等の点で他の抽出法によつて得られた内毒素と比較して遜色なく，収量の点ではかなり良い結果が得られた．

本報告においては90％石炭酸による内毒素の抽出法についての検討と，得られた粗毒素の発熱性，毒性，抗原性その他の生物学的性状の概略について述べる．なお化学的事項については共同研究者西村等の論文がある[3]．

内毒素の抽出 内毒素の抽出に使用した菌株は主としてShigella flexneri 2bの流行株2株（K_3及びK_6株）で，駒込病院に入院した疫痢患児から分離され（K_3株は1955年6月，K6株は1957年1月）．同病院小針博士から分与を受けたものである．

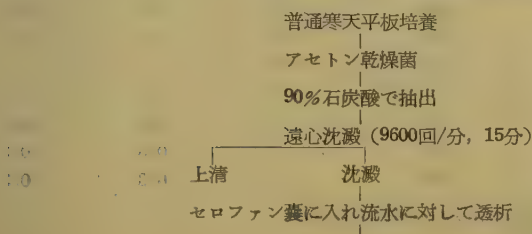
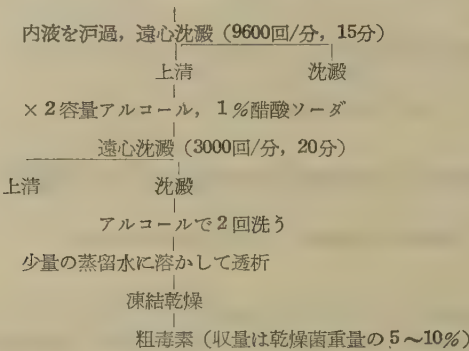
菌の培養には普通寒天培地（ポリペプトン1％，極東エールリッヒ肉エキス1％，食塩0.2％，精製寒天1％）を用い，ペトリ皿で培養し，かき集めた菌は直ちにアセトン中に投入して乾燥菌体を得た．乾燥菌体重量は湿菌の約1/4で，培地1000cc当り約1gの乾燥菌体が得られた．

内毒素の抽出には90％（容量比）の石炭酸を用い，乾燥菌体1gを5ccの石炭酸に混じて均質となるまでよく攪拌する．Sh. flexneri 2bK_3株の内毒素は90％石炭酸に不溶であつて，石炭酸菌液を遠心沈澱して得られた沈澱部分から抽出された．しかしEscherichia coli O-3の場合には上清及び沈澱の両方から内毒素と考えられる物質が分離された．

Sh. flexneri 2bの場合には石炭酸菌液を9600回/分，15分間遠心沈澱し，得られた沈澱をセロファン嚢中に入れ流水に対して48～72時間透析を行ない，内液から石炭酸が消失したのち沪過と遠心沈澱（9600回/分，15分間）によつて不溶部分を除く，上清に1％の醋酸ソーダの存在の下に2倍量のアルコールを加え生じた沈澱をアルコールで2回洗い少量の蒸留水に溶かして一晩透析を行なつたのち凍結乾燥する．ここで得られる粗毒素の収量は乾燥菌体重量の5～10％，微かに淡黄色を帯び，その1％水溶液は軽い蛋白白濁を呈し，biuret，ninhydrin両反応陽性，molish反応強陽性で多糖類を主成分とすると考えられる．

以上述べた抽出法の概要を第1表に示す．

第1表 90％石炭酸による内毒素抽出法の概要

内液を沪過，遠心沈澱（9600回/分，15分）
上清　沈澱
×2容量アルコール，1％醋酸ソーダ
遠心沈澱（3000回/分，20分）
上清　沈澱
アルコールで2回洗う
少量の蒸留水に溶かして透析
凍結乾燥
粗毒素（収量は乾燥菌重量の5～10％）

粗毒素の生物学的性状　Sh. flexneri 2b K_3 株の粗毒素は全菌免疫血清に対して16～24万倍稀釈まで沈降反応を示した．

K_3 株内毒素をウサギの耳静脈内に3日間隔で100γ，100γ，200γを注射し，最終注射後7日目に採取した血清は K_3 株生菌との間に800倍稀釈まで凝集反応陽性であつた．

ウサギに対する発熱性試験の成績は第2表の如くであつて，0.01γ/kg を静注したウサギは5匹中4匹に0.6°C以上の発熱がみられた．また10mg/kg及び100mg/kgを経口投与した場合には6時間後（途中でエサを与えた）に夫々0.5°Cの体温上昇がみられた．

第2表　Sh. flex. 2b K_3 株粗毒素のウサギに対する発熱試験

注射量 / ウサギ番号	0.1γ/kg	0.01γ/kg		0.005γ/kg	0.001γ/kg	
	Lot No. Ⓐ	Lot No. Ⓑ	Lot No. Ⓐ	Lot No. Ⓑ	Lot No. Ⓑ	Lot No. Ⓐ
Ⅰ	1.1°C	1.0	0.8	0.1	0.2	0.3
Ⅱ	0.9	0.6	0.6	—	—	—
Ⅲ	0.8	0.6	—	—	—	—

〔註〕温度は注射後4時間までの最高体温上昇を示す．
—：は体温上昇をみとめなかつたもの．

Sh. flexneri 2b（K_3 及び K_6 株），Sh. sonnei（EW33株），E. coli O-1 及び O-55 から抽出した粗毒素をマウスの腹腔内に注射し毒性試験を行なつた結果を第3表に示す．いずれの菌株についても100％致死量と100％生存量とはかけはなれた値を示している．最も強い毒性を示したSh. flex. 2b K_6 株粗毒素は体重15gのddN系マウス腹腔内注射で0.075mgのLD_{50}を示すが，この毒素による数回の実験結果を集計すると，1mgの注射によつても16匹中1匹が生存し，0.01mgの如き少量でも30匹中1匹が内毒素にもとづくと認められる症状で死亡している．2mgの注射に耐えたマウスはいなかつた（10匹中）．

第3表　粗毒素のマウスに対する毒性（腹腔内注射48時間観察）

注射量	Sh. flex. 2b K_3 株 実験Ⅰ	Sh. flex. 2b K_3 株 実験Ⅱ	Sh. flex. 2b K_6株	Sh. sonnei EW33株	E. coli O-1	E. coliO-55
1.0mg	4/5	3/3	5/5	4/5	3/3	3/3
0.5mg	4/5	2/3	5/5	3/5	—	—
0.2mg	3/5	2/3	3/5	0/5	—	—
0.1mg	1/5	2/3	3/5	0/5	2/3	1/3
0.05mg	0/5	0/3	2/5	—	0/3	0/3
0.02mg	0/5	0/3	2/5	—	0/3	0/3
0.01mg	0/5	0/3	0/5	—	0/3	0/3

〔註〕分母は注射総数，分子は死亡マウス数マウスはddN系，13～15g．

5匹のマウスにK_8株粗毒素を5mgずつ経口投与したが著明な症状を呈するものなく，すべて生残つた．

結論

90％石炭酸を用いる内毒素の抽出法は赤痢菌や大腸菌についても簡便で収量がよく，トリクロル醋酸，チエチレングリコール，ピリヂン等を用いて抽出された内毒素についての従来の報告と比べ生物学的活性の点で特に遜色をみとめなかつた．

終りにのぞみ種々の御援助をいただいた東京大学秋葉教授と発熱試験を担当してくださつた当所薬理部の方々に深い感謝の意を表する．

文献

1) John W. Palmer and Tillman D. Gerlough : *Science*, 92, 155—156 (1940).

2) W. T. J. Morgan and S. M. Partridge : *Biochem. J.*, 35, 1140—1163 (1941).

3) 西村，中村，大渕，岩原，野崎：*J. Biochemistry*, 44 (1957). 印刷中

Summary

90％ phenol was used for the preparation of endotoxin from two strains of freshly isolated Shigella flexneri 2b, Sh. sonnei (EW33 strain) and E. coli (O-1 and O-55).

Crude endotoxin extracted from Sh. flex. 2b K_8 strain showed precipitin titre of 160,000～240,000, and was antigenic when injected intravenously into rabbit.

Four of five rabbits to which 0.01γ/kg dose of K_8 endotoxin was injected intravenously, showed temperature rise of more than 0.6°C.

LD_5 dose was 0.075mg per a mouse when Sh. flex. 2b K_6 endotoxin was used for the intraperitoneal injection of mouse (ddN strain, 13～15gr.).

Received June 18, 1957.

Zone ElectrophoresisによるShigella flexneri 2bの内毒素の精製(予報)

西 村 千 昭, 中 村 正 夫, 野 崎 泰 彦

Purification of the Lipopolysaccharide of *Shigella flexneri 2b* with Starch Zone Electrophoresis. (Preliminary Communication)

Chiaki NISHIMURA, Masao NAKAMURA and Yasuhiko NOZAKI

澱粉柱を用いる電気泳動は1952年 Kunkel & Slater[1] によつて始められ，主として血清蛋白の分離に応用された．Cluff[2] (1954) は*Shigella flexnexi* type Zの内毒素について Zone electrophoresis をおこない，これを3つの分画に分けることに成功した．それ以来，毒素の精製，毒素と蛋白の結合の研究に広く用いられている．著者らは赤痢菌*Shigella flexneri 2b* (K_3) 内毒素の精製にZone electrophoresis を応用し，この方法で分けられた3つの多糖体複合体を構成する糖，アミノ酸について検討した．

実 験 の 部

材 料 *Shigella flexneri 2b* (K_3) から石炭酸抽出で得た粗毒素200～400mgを蒸留水6ccにとかし，前報[3]で述べた方法で精製アセトンによる分画を行い，アセトン25～50%で沈澱する分画を用いた．

K_3-Strain毒素のZone electrophoresis

澱粉柱に用いた箱は厚さ3mm，1.5×5×36cm のアクリル樹脂製で蓋を有し，両端より2cmの位置にある篩板の内側に沪紙をおいて緩衝液と練つた澱粉をつめる．試料60～80mgを緩衝液3～4ccにとかし，予め調製した乾燥澱粉で煉つて澱粉柱と同じ硬さにして原点に埋める．篩板の外側の室には緩衝液を浸したガーゼをつめ，沪紙片で電極槽につなぐ，泳動後，澱粉柱を1cmずつに切り取つて水で抽出し，遠心分離して上清の一部について沈降反応の試験及び Anthrone 法による比色をおこなつた．Fig. 1はM/20硼砂緩衝液 pH9.0を用いて1mA/cmの定電流で泳動させたときのAnthroneによる呈色物質の分布を示す．

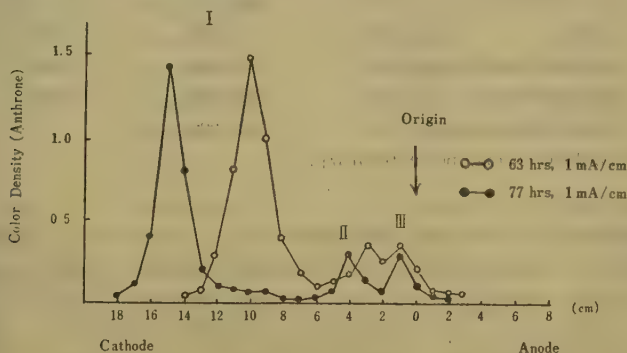



Fig. 1. Zone Electrophoresis of Lipopolysaccharide on Starch Column with M/20 Borax Buffer (pH 9.0)

得られる3つのピークを陰極側よりⅠ，Ⅱ，Ⅲとすると，沈降反応はそれぞれ32万倍，1万倍，1万倍である．それ故Ⅰが毒素の主成分と考えられる．

Fig. 2はM/10燐酸緩衝液でおこなつた結果である．この条件ではⅡ，Ⅲは陽極側に，Ⅰは陰極側に泳動する．Ⅰの隣りに小さなピークを認めるが，収量が極めて悪いため検討していない．ピークの収量はⅠ＝30〜40%，Ⅱ＝15〜20%，Ⅲ＝20%である．

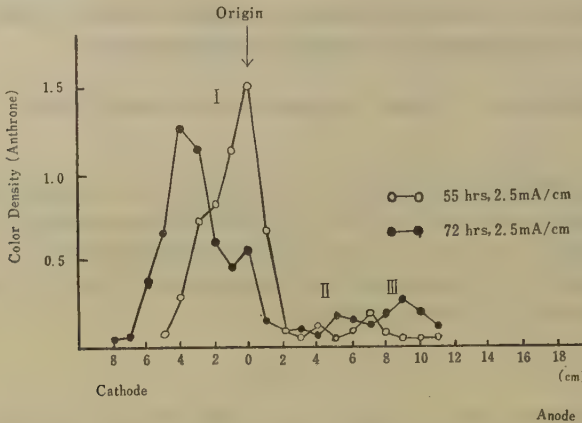



Fig. 2. Zone Electrophoresis of Lipopolysaccharide on Starch Column with M/10 Phosphate Buffer (pH6.0)

Table 1に精製の段階における凍結乾燥品についてN%，Precipitin titer 及び抗原に結合する抗体蛋白のN量を測定した値を示す．粗毒素に比べると沈降価で約8倍の上昇を認めた．主成分であるⅠは1%酢酸水解により脂質，ペプチド，多糖体に分解され，沈降価は変らないが毒性を失う．

Table 1. Purification of Lipopolysaccharide with Zone Electrophoresis

Fractionation	N%	Precipitin titer	Activity*
Crude	4.2	40,000	0.010
Acetone fractionation	2.8	160,000	0.021
Refractionation	2.3	160,000	0.067
Zone electrophoresis	2.0	320,000	—

* Precipitated antibody N mg. per antigen mg.

加水分解物のペーパークロマトグラフィー

Table 2に硼酸塩緩衝液を用いたときの分画Ⅰの加水分解物のペーパークロマトグラフィーの結果を示す．Ⅰを100mgとり，1%酢酸10ccで4時間水浴上で加水分解する．沈澱物と上清に分け，沈澱は1%酢酸で洗つてのちクロロホルムで脂質を抽出する．残渣はペプチドより成り．6N塩酸で加水分解することにより（フェニルアラニン）アラニン，グルタミン酸，シスチン，リジンを検出する．上清と洗液を合わせて透析し，真空で凍結乾燥する．その10mgを2N塩酸で10時間加水分解し，塩酸を除去し，少量のメタノールにとかしてペーパークロマトグラフィーをおこなうと，ラムノーズ，グルコーズ，グルコサミン及びRf-値の低い糖を検出した．

Table 2. Paper Chromatography of Hydrolysis of Purified Lipopolysaccharide (Fraction I)

Polysaccharide	Rf-Value* Phenol-Water (4:1)	Rf-Value* But-Ac-Water (4:1:5)
Rhamnose	0.556	0.346
Glucose	0.346	0.185
Glucosamine	0.189	0.110
Unidentified	0.08	0.11
Polypeptide		
(Phenylalanine)	0.69	0.51
Alanine	0.58	0.33
Lysine	0.39	0.22
Glutamic acid	0.28	0.15
Cystine	0.15	0.06

* Whatman No. 1.

II及びIIIの分画のそれぞれ5～8 mgを2N塩酸で加水分解をおこない，減圧で塩酸を除いてのち少量のメタノールにとかしてペーパークロマトグラフィーをおこなつた結果をTable 3に示す．II物質ではグルコサミンと低Rf値の糖を認め，アミノ酸はアラニン，グルタミン酸，リジン，シスチン，(フェニルアラニン) を含んでいる．IIIでは糖としてグルコサミンを検出し，アミノ酸としてグルタミン酸を検出した．いずれも標準物質のRf-値と比較して決定した．I．IIで検出される低Rf値の糖はRf値からウロン酸かと思われたが，Naphtoresorcinol反応を示さない．

Table 3. Paper Chromatography of Hydrolysis of (II) and (III)

		Rf-Value Phenol-Water	Rf-Value But.-Ac.-Water
	(II)		
Sugars	Glucosamine	0.185	0.143
	Unidentified	0.073	0.12
Amino acids	(Phenylalanine)	0.70	0.6
	Alanine	0.580	0.33
	Lysine	0.331	0.22
	Glutamic acid	0.231	0.135
	Cystine	0.11	0.07
	(III)		
Sugar	Glucosamine	0.187	0.142
Amino-acid	Glutamic acid	0.289	0.175

K_6-Strainの毒素について

以上の実験はすべてK_3-Strainについておこなつたもので，新しく疫痢患者より分離されたK_6-StrainからK_3と同様にして毒素を抽出するとFig. 3に示すように陰極側に近接した2つのピークを認める．いずれのピークもK_3毒素抗血清に対して8万倍稀釈で沈降反応を示す．又K_6-srainの毒素はK_3-strainの毒素に比して毒力は強い．

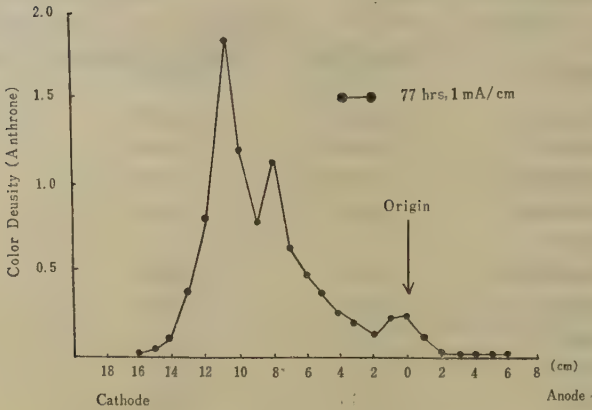



Fig. 3. Zone Electrophoresis of Lipopolysaccharide of K_6 Strain

考　　察

Cluff は*Shigella flexneri* type z の毒素を pH8.6のベロナール緩衝液で Zone electrophoresis をおこない，泳動図から分離は良好とはいえないが，3つの分画を得ている．またTrypsin水解とLysozyme処理をおこなつた毒素の泳動図を対照毒素のそれと比較して，これら3つのピークはハプテンが共通で蛋白部分を異にする3つの物質であると報告している．著者らが*Shigella flexneri 2b*のK_3及びK_6-strain から石炭酸抽出で得た毒素は澱粉柱による電気泳動で3つの分画にはつきり分れることが示された．この毒素はCluff の得たものと異つて蛋白の吸収は示さないが，加水分解物のペーパークロマトグラフィーはいずれも多糖体とペプチドを含んでいることを示す．主成分であるＩの分画は脂質，ペプチド，多糖類の複合体であることは明らかである．Ⅱ及びⅢはＩと異り糖，アミノ酸の種類が少ないことからＩの分解成績体又は生合成中間体と考えられる．

本研究にあたり終始御鞭撻を賜わつた所長刈米達夫博士に深謝する．粗毒素の抽出をおこなわれた衛生細菌部岩原繁雄博士，大淵令子技官に謝意を表する．

文　　献

1) Kunkel, H. C. and Slater, R. J. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 80, 42 (1952).
2) Cluff, C. E. : *J. Exp. Med.*, 100, 391 (1954).
3) Nishimura, C., Nakamura, M., Ofuchi, R., Iwahara, S., and Nozaki, Y., : *J. Biochem.*, 44, (1957) in press.

Summary

O-antigenically and toxically active lipopolysaccharide of two strain of *Shigella flexneri 2b* K_3 and K_6 were purified by starch zone electrophoresis. The main component (Ｉ) which composed the endotoxin of K_3 strain migrate closed to cathode with M/20 borax buffer of pH 9.0. There were obtained two other inactive components, (Ⅱ) and (Ⅲ). (Ｉ) was shown to be composed of lipide, polysaccharide (rhamnose, glucose, glucosamine, and unidentified sugar), and peptide (phenylalnine, alanine, lysine, glutamic acid and cystine). (Ⅱ) was shown to be composed of polysaccharide (glucosamine, unidentified sugar), and peptide (same amino acid composition as Ｉ). (Ⅲ) was identified as a complex which was composed of glucosamine and glutamic acid.

Electrophoretic pattern of zone electrophoresis of lipopolysaccharide which was extracted from K_6 strain showed that the lipopolysaccharide of this strain might be composed of somewhat different components, particularly the one corresponding to the fraction Ⅱ, from those obtained from K_8 strain.

Received June 18, 1957.

ゲル内抗原抗体反応（Ouchterlony法）による赤痢菌（*shigella flexneri 2b*）のO抗原の分析について

中 村 正 夫，上 山 栄 一，岩 原 繁 雄

Analysis of O-Antigen of *Shigella flexneri 2b* by Antigen-Antibody Reactions in Gels (Ouchterlony Method).

Masao NAKAMURA, Ei-ichi UEYAMA and Shigeo IWAHARA

まえがき　抗原抗体反応をゲル内，例えば寒天層中で行う方法は，抗原抗体系の分析に極めて鋭敏で，しかも比較的簡単に行う事が出来るので，今日広く免疫化学的方面にも応用されている．この様な現象は，はじめPetrie[1]により観察されていたが，その後Oudin[2]により系統的な研究がなされた．即ち，小試験管を用い，抗血清加寒天上に抗原液を重層，(simple diffusion method)，或は中間に寒天層を入れ，その上に抗原液を重層する事により（double diffusion method）複合抗原抗体系を分析する方法を行つている．更にOuchterlony[3]は寒天平板を用いて抗原抗体反応を行う事により，二種以上の複合抗原抗体系を分析比較するという方法を発表した．

吾々は疫痢患者から分離した*Shigella flexneri 2b*（K-3株）を用い，Palmer法[4]に準じて90%phenolによる菌体成分の抽出を行い，得られた内毒素の毒性及び抗原性の本態は lipopolysaccharide（LPS），であることを報告した[5]更にLPS分画を燐酸カルシウムゲルを用いるクロマトグラフィー，及び zone electrophoresis により精製を行い，各 fraction の化学的免疫学的性状及び毒性をしらべると同時に，Ouchterlony 法を用いてその均一性及び沈降帯の位置の関係について検討を加えた．本報告ではOuchterlony法の結果について述べる．

実 験 方 法

抗原　：K_3菌のアセトン乾燥菌に90%phenol を加えて抽出した粗毒素（Fr. 1）及びこれを更にアセトンで分画したLPS（Fr. 2）を抗原として用いた．LPS は更に Kunkel の zone zlectrophoresis を行う事により三つの fraction に分けられる．この中最も高い抗原価を示した物質（I）[6]についても均一性を検討した．

免疫血清　：菌体，Fr. 1 及びFr. 2 を用いて家兎免疫血清をつくつた．その方法並びに量は第 1 表に示す如くである．

Table 1. Immunization by different Fractions.

Antigens ＼ Times	1	2	3	4	Aggl. titer
Crude toxin	0.2mg	0.4	1.0	2.0	12,800
LPS	0.05	0.1	0.2	0.2	25,600
Whole cell	0.5	1.0	2.0	2.0	25,600

拡散用培地　：1%寒天をつくり，これを2昼夜水洗し1.6%食塩水を同量加え沪紙で沪過したものにMerthiolate 及び Methyl orange を加える．培地組成は第2表に示す．

Table 2.　Diffusion Medium

Good quality agar	0.5%
NaCl	0.85%
Merthiolate	0.01%

* 日本医大衛生学教室

Methyl orange　　　　　　　　0.003%
pH7.0～7.4

Merthiolate は雑菌の発育を阻止し，Methylorange は沈降帯を写真にとる場合の contrast をつける為に加える．

この寒天培地を90mm直径のシャーレに分注し，第1図に示す如き位置に10mm×10mmのbasinをつくる[7] このbasin Ⅰ,Ⅱ には抗原を，basinⅢには免疫血清をそれぞれ0.2～0.3ml 入れて37°C に放置すると，抗原分子の拡散速度の違い，或いはその系の抗原抗体の濃度や最適比の差異に基いて沈降帯が現われる．即ち，単一抗原抗体系では一本の沈降帯が出来，複合抗原抗体系では，その系の数に応じて沈降帯が生ずる．したがつてこの事から抗原の均一性を知る事が出来る．

実 験 結 果

1.　**有効抗原稀釈濃度**：Fr. 2 について 1 mg/ml～0.03mg/mlの各種濃度を用い．Fr. 2 免疫血清との間に沈降帯を生じ得る最大稀釈濃度を検討した結果，0.06mg/ml まで認める事が出来た．しかし沈降帯の位置は抗原濃度が低くなるにしたがつて，次第に血清の basin 側に近く生ずる．しかし，沈降帯を明瞭に，且つ早く見る為には10mg/mlを用いる方が好成績を示すので，本実験では，この濃度を主として用いた．

2.　**菌体免疫血清と各 Fraction との沈降帯**：第3表に示す如く acetone 分画のいずれの fraction との間にも3本の沈降帯を示した．この事は Fr. 2（acetone25～50%）を燐酸カルシウムゲルを用いるクロマトグラフィーによつて溶出した場合第1図に示す如く3つのピークを示す事とも一致している．またアセトン乾燥菌体浮游液10mg/ml との間でも3本の沈降帯を示したが，Fr. 2 を Kunkel の zone electrophoresis で分画して得たⅠ物質とは1本の沈降帯を示し．（第3図参照）この fractionが単一の抗原抗体系からなつている事を想像せしめる．

Table 3.　Toxicity and Antigenicity of Different Fractions

Fraction (acetone%)	Toxicity (dose in mg)	Precipitin titer	Antigenicity (antiserum aggl. titer)	Number of precipitate patterns
1 (crude)	2/4 (0.1)	40,000	12,800	3
2 (25～50)	2/4 (0.1)	160,000	25,600	3
3 (50～66)	2/4 (0.1)	160,000	51,200	3
4 (66<)	0/4 (2.0)	—	—	3
Zone electrophoresis (Kunkel) (main fraction)		320,000	—	1

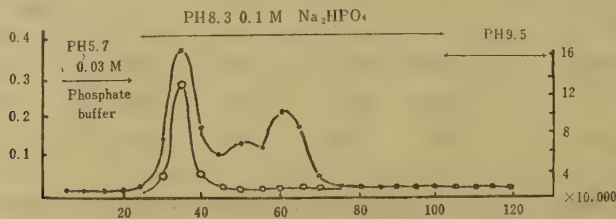



Fig. 1.　Column Chromatography of Endotoxin on Calcium Phosphate Gel.
Acetone 25～50% Fraction

•————• Anthrone (S-58)
○————○ Precipitin titer (dilution)

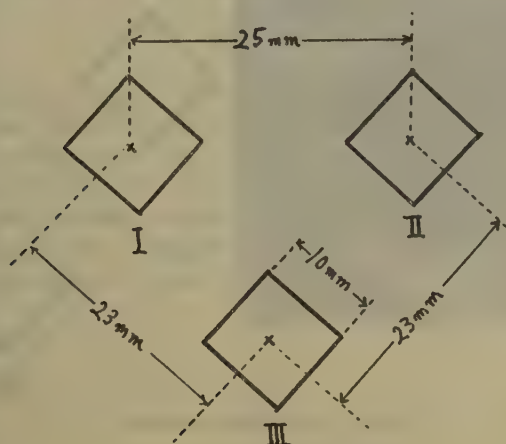



Fig. 2. Arrangement of Basins (Ouchterlony method,).

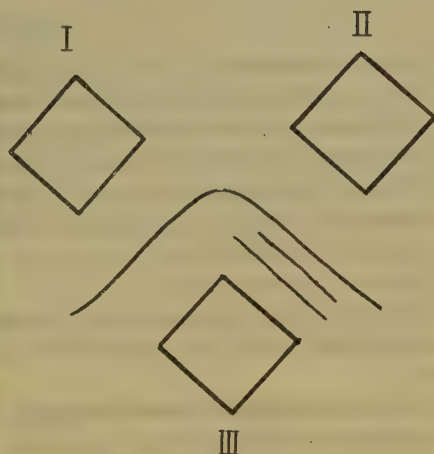



Fig. 3. Precipitation Patterns

I. Main fraction of zone electrophoresis (Kunkel).
II. LPS.
III. Whole bacteria immun serum.

3. **Fr. 1及びFr. 2免疫血清と各Fractionとの沈降反応**：Fr. 1及びFr. 2免疫血清はいずれのfractionとも1本の沈降帯を示す．(第4図参照) Fr. 1及び2と菌体免疫血清との間では3本の沈降帯を示すが，Fr. 1及び2免疫血清との間では1本の沈降帯を示すに過ぎない事から菌体は3つの完全抗原を有し，Fr. 1及び2は1つの完全抗原と2つのハプテンとからなつている事が考えられる．

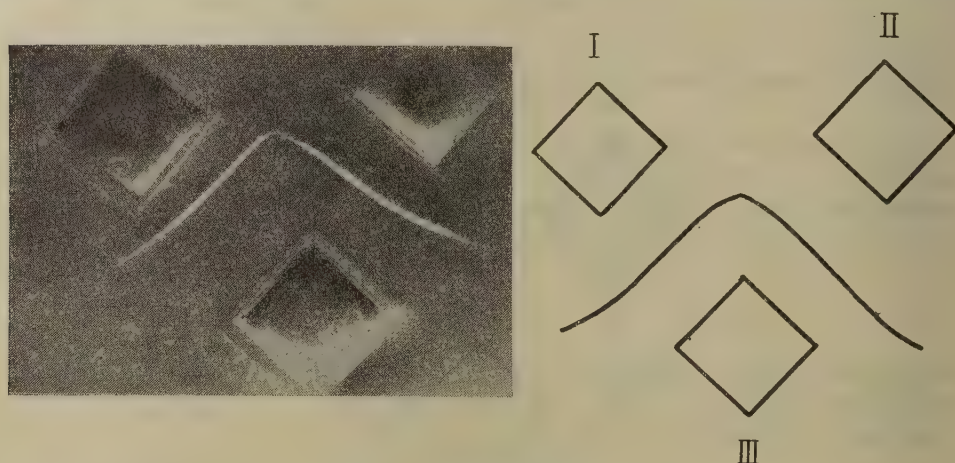



Fig. 4. Precipitation Patterns

I. LPS.

II. Crude toxin.

III. Crude toxin immun serum.

総括並びに考察

1948年Ouchterlonyによつて行われたゲル内抗原抗体反応は，抗原の均一性或いは2種抗原間の関係を検討する方法として興味あるもので，吾々も*Shigella flexneri 2b*（K-3株）から抽出した粗毒素（Fr1）LPS分画（Fr.2）及びKunkelのzone electrophoresisにより精製された物質（I）について．粗毒素免疫血清，LPS-免疫血清及び菌体免疫血清との間にOuchterlonyの方法を試みた．その結果，菌体は3つの完全抗原をもち，粗毒素及びLPS分画は1つの完全抗原と2つのハプテンとを有する事が想像されzone electrophoresisにより分画された物質は精製され，抗原的にも可なり均一化されたものであると考えられる結果を得た．しかしこの精製された抗原が菌体のもつ三つの抗原のどれに相当するか，また従来の免疫学方面で用いられている型抗原，群抗原との関係については，なお不明な点が多い．

Ouchterlony法における沈降帯の位置及び排列は抗原及び抗体の濃度に影響され[8]一つの沈降帯が他の沈降帯の形成に影響する場合もあるといわれ[9),10),11]複合抗原抗体系の分析を行う為に必要な検定条件についても検討したい．

終りに臨み終始御懇篤なる御指導，御校閲を賜つた恩師八田貞義博士に深甚なる敬意を表します．また種々実験に御支援下された西村氏に厚く御礼申し上げます．

文　献

1) Petri. G. F. : *Brit. J. Exp. Path.* 13 : 380 (1932).
2) Oudin. J : *Ann. Inst. Pasteur.* 75 : 30 (1948).
3) Ouchterlony. Ö : *Lancet.* 1 : 346 (1949).
4) Palmer. J. W. and Gerlouch. T. D : *Science* 92. 155 (1940).
5) 西村千昭，中村正夫，大淵令子，岩原繁雄，野崎泰彦：日本生化学会関東支部11月例会講演 (1956).
6) 西村千昭，中村正夫，野崎泰彦：衛生試験所報告 75, 225 (昭32)
7) Wilson. M. W. and Pringle. B. H : *J. Immunol.*, 73. 232 (1954).
8) Ouchterlony. Ö : Acta *Path. et. Microbiol., Scandinav.*, 32. 231 (1953).
9) Wilson. M. W. and Pringle. B. H : *J. Immunol*, 77. : 324 (1956).

10) Björklund. B : *Proc. Soc. Exp. Biol.* and *Med*, 79. 319 (1952).
11) Wilson. M. W. and Pringlel. B. H : *J. Immunol.*, 75. 460−469 (1955).

Summary

Endotoxin of *Shigella flexneri 2b* (K_3) was extracted with 90% phenol (crude endotoxin), and purified by fractionation with acetone. Further purification was made with zone electrophoresis In this way, different antigens were prepared from this strain and antigen analysis of these fractions by means of Ouchterlony's gel diffusion method was studied.

It has been shown by this method that whole cell of this strain contained 3 complete antigens, but crude and purified endotoxin with acetone (25～50%) may contain 1 complete and 2 incomplete antigens (hapten) and purified main fraction with zone electrophoresis contained single antigen.

Received June 18, 1957.

食品の異物検査法(第3報)

宮島弘衛，小川秀子，野崎泰彦

Microanalytical Test of Food Products. III.

Hiroe MIYAJIMA, Hideko OGAWA and Yasuhiko NOZAKI

まえがき　第1報，第2報において，パン類，ビスケット，ピーナッツバター，ピーナッツクリーム，粉乳等の異物検査についてそれぞれ報告[1,2]したが，今回は板チョコレートの検査法について従来の衛生検査指針（III）1952年版異物衛生検査法に記載している方法を改良したので，ここに報告する．

実験の部

改良方法

板チョコレート1枚(約21～23g)を5%ホウ砂溶液100ccにとかし，5分間煮沸する．直ちに純アルコール100ccを徐々に加えて15分間放置する．これにTween80の60%アルコール溶液（容積比1：50）100ccを加え．ガソリン35ccを加え，直ちにEthylenediaminetetraacetate-4Na（以下EDTAとする）の60%アルコール液（2.5g/100cc）100ccを加え，はげしく5分間かきまぜる．以下常法通り60%アルコールでフラスコを充し，ガソリン層を捕集し沪過して鏡検する．

以上の如き方法で1個の試料に対してネズミの毛5本，ダニ10匹を入れ実験したところ発見した数は次の如くである．

実験番号 / 捕集回数 / 異物の種類	I			II			III			IV			V		
	1	2	合計	1	2	合計	1	2	合計	1	2	合計	1	2	合計
ネズミの毛	4	1	5	4	0	4	3	2	5	3	0	3	4	0	4
ダニ	9	0	9	9	0	9	0	0	0	3	0	3	8	0	8

上の表より明らかなように，ネズミの毛の発見率はかなり良好であるのに対して，ダニの発見率はまちまちであることは，生きたダニを用いたため操作中に逃げたものがあつたのではないかとも思われるが，この点に関しては更に検討したい．

総括

従来の方法ではチョコレート組織が充分細かく分散しないため，沪過に際して沪紙を用いることができず，篩を用い，かつ油脂分を去るため多量のアルコール，クロロホルム及び熱湯で洗う必要がある．この実験によりEDTAとTween80を用いることにより操作が簡易化され，又高価な溶媒を多量に使うことなく，充分検査の目的は達せられることが明らかにされた．

文献

1） 野崎，宮島，清水：本誌，72，191（1954）．
2） 宮島，小川，野崎：本誌，74，279（1956）．
3） 厚生省編纂：衛生検査指針（III）（1952）．
4） Assoc. Offic. Agr. Chemists, "Methods of Analysis", 1950, 7 th ed.

Summary

Sodium ethylenediaminetetraacetate and Tween 80 in aqueous alcoholic media were shown to be effective to disperse chocolate tissue in the solution and could profitably be used in microanalysis of chocolate. This method is simpler and less expensive.

Received June 18, 1957.

合成樹脂製容器の研究（第1報）
赤外線吸収スペクトルを応用せる定性及び溶出物の検討*

川 城　巌，岡 田 太 郎，大 場 琢 磨

Studies on Packaging in Synthetic Resins (I)
Some Applications of IR. Spectroscopy in the Qualititative Analysis of Synthetic Resins, and Detection of Materials Extracted from Synthetic Resins.

Iwao KAWASHIRO, Tarō OKADA and Takuma ŌBA

まえがき　現在一般に市販される合成樹脂製器具類についての衛生試験の術式は既に公にされているが，われわれがこの試験を行うに当り，その樹脂の本質を明らかにすることが必要である場合がある．ところが従来の化学分析法ではなかなかこの目的は達成し難い憾があり，とくに可そ剤，着色料その他の添加物が使用されているときは益々困難である．そこで近時発展した赤外線分析をこの面にも応用して見ようとして，一，二の実験を試みた．なお各種合成樹脂製の食器類に種々の溶媒を満し一定条件下で溶出してくる物質についても若干の検討を行つた．

実 験 方 法

実験装置　東京大学工学部綜合試験所のBaird製記録式赤外分光器を使用した．

標準スペクトル　U. S. Department of Commerce及びP. E 社[1]より出されているもの．

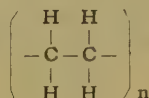
実験操作　ポリエチレン，ビニール系樹脂等フィルム状のものはそのまま測定し，スチロール，アクリル樹脂はクロロホルムに溶解したのち薄膜法を用いてフィルム状としたのち測定した．尿素，メラミン及びフェノール樹脂等の成型原料及び成型品（容器）は200メッシュ程度の乾燥粉末としKBr錠剤法によつて測定した．なお尿素，メラミン，フェノール樹脂等はその砕片20gに4%酢酸100ccを加え1時間煮沸し，その酢酸液を蒸発濃縮したのちKBr錠剤法またはNujol法によつて溶出物の測定を行つた．

KBr　錠剤法　約1～2mgの試料に約0.5gのKBr粉末(200メッシュ以下)とよく混ぜ合せ約3mmHgで約40,000 lb/in^{2}の圧力で15分間圧搾して錠剤とした．

ビニール系樹脂は多量の可そ剤が混入しているため，これらの可そ剤が油脂類によつて溶出されることが考えられるので試料を豚脂に100°で1時間浸漬し，この試料のIRを測定したのち浸漬前の試料のIRと比較した．

実 験 結 果 及 び 考 察

ポリエチレン樹脂(厚さ0.035mm)（Fig. 1）フィルム状のものをそのまま測定したところ3.4～3.5，6.85，7.28 7.70，13.87 及び 13.66μ にCHによる吸収を有していて標準スペクトルと比較することによつて容易に他と区別し得た．

$$\left(\begin{array}{c} \mathrm{H}\quad\mathrm{H} \\ |\quad\;\; | \\ -\mathrm{C}-\mathrm{C}- \\ |\quad\;\; | \\ \mathrm{H}\quad\mathrm{H} \end{array}\right)_n$$

* 第77回日本薬学会年会にて発表（1957）

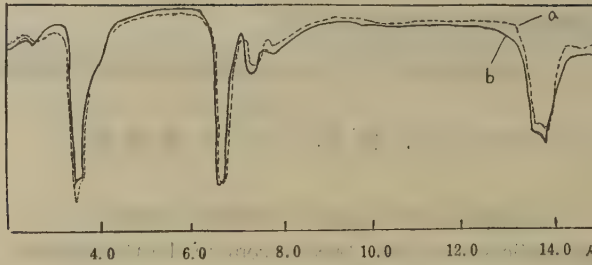



Fig. 1. a Polyethylene film (0.035mm)
b Standard polyethylene (0.025mm)

スチロール樹脂（Fig. 2）

容器をクロロホルムに溶解し薄膜として測定した（厚さ0.23mm）．標準IRと比較して定性した．3.4，3.50，6.88μにメチレンの吸収があり，3.26，3.30，5.12，5.33，5.52，5.72，6.23，6.70，9.73，13.2，14.3μにフェニール基に関する吸収が見られる．

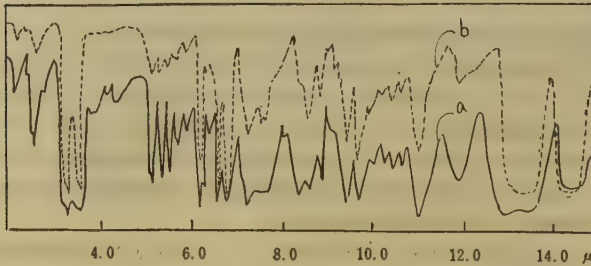
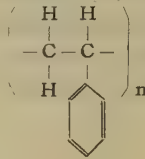



Fig. 2. a Polystyrene molded materials (0.23mm)
b Standard polystyrene (0.07mm)

アクリル樹脂（Fig. 3）

メタアクリル酸メチルエステルの重合体でスチロール樹脂と同様にクロロホルムに溶解したのち薄膜として測定した（厚さ0.06mm）．3.4～3.37μ，のCH_3，5.77μのC＝O，8～9μのC－O－Cに基く吸収によつて確認した．

$$\left(\begin{array}{cc} H & CH_3 \\ | & | \\ -C- & C- \\ | & | \\ H & C=O \\ & | \\ & O-CH_3 \end{array} \right)_n$$

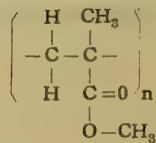
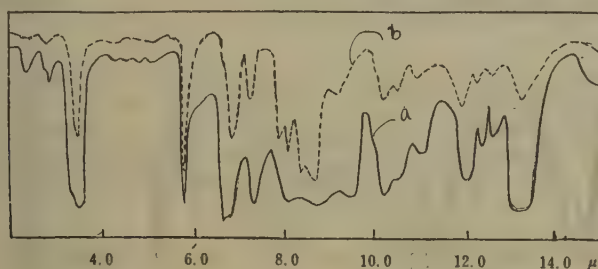
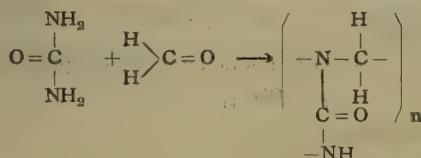



Fig. 3. a Acrylic Resin (0.06mm)
b Standard polymethyl methacrylate (0.02mm)

尿素樹脂（Fig. 4）

一部を微粉末としKBr錠剤法によつて測定した．3.02μにNH，3.4〜3.49μにCH，6.05μに $-\overset{\displaystyle O}{\overset{\|}{C}}-NH$ 基等による吸収によつて確認した．

$$O=C(NH_2)_2 + \begin{matrix}H\\H\end{matrix}\!\!>C=O \longrightarrow \left[\begin{matrix} & & H & \\ -N & - & C & - \\ | & & H & \\ C=O & & & \\ | & & & \\ -NH & & & \end{matrix}\right]_n$$

尿素樹脂の４％酢酸溶出物はホルマリンのほか多量の白色の溶出残留物が認められた．これをNujol法によつてIRを測定したところ，3.0，3.45（Nujol），6.05，6.4，6.8（Nujol），7.2μ（Nujol）のほか8.0，8.9，9.75μ等に吸収があつた．これらについては現在検討中である．

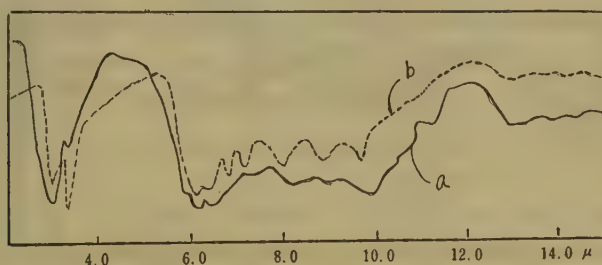
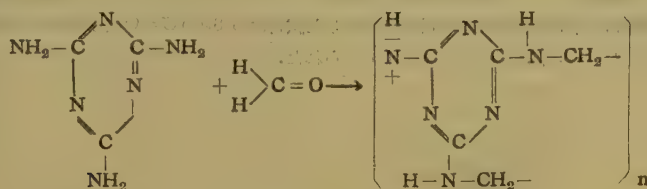



Fig. 4. a Urea-resin
b Elution materials from Urea-resin

メラミン樹脂（Fig. 5）

2.97μにNH，3.4〜3.49μにCH，6.43μにC＝Nの吸収あり，12.28μにトリアヂン核の特異な吸収によつて他の樹脂と区別し得た．

$$C_3N_3(NH_2)_3 + \begin{matrix}H\\H\end{matrix}\!\!>C=O \longrightarrow \left[\begin{matrix} H & & & H \\ -N-C & \!\!\!N\!\!\! & C-N-CH_2- \\ | & & \| & \\ N & & N & \\ & C & & \\ & | & & \\ & H-N-CH_2- & & \end{matrix}\right]_n$$

メラミン樹脂の4%酢酸溶出物は尿素樹脂に比較してわずかでありメラミンモノマー（Fig. 5）の吸収とよく一致していた．

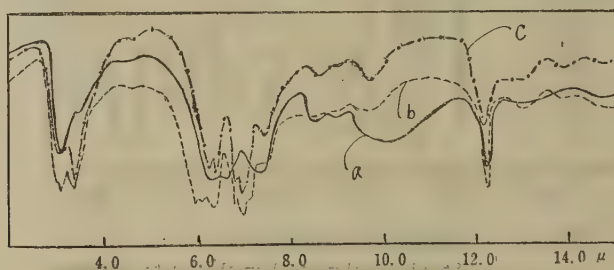
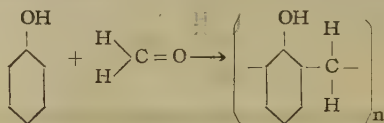



Fig. 5.　a　Melamine-resin
　　　　b　Elutionmaterials from melamine-resin
　　　　c　Melamine-monomer

フェノール樹脂（ノボラック型）（Fig. 6）

3.08μにOH，3.45μにCH，8.0μにフェノールのOH，11～15μの間に芳香族の化合物を示す吸収が見られた．

$$\text{C}_6\text{H}_5\text{OH} + \begin{matrix}\text{H}\\ \text{H}\end{matrix}\!>\!\text{C}=\text{O} \longrightarrow \left[-\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})-\overset{\text{H}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}- \right]_n$$

フェノール樹脂の4%酢酸溶出物のIRは6.45～6.9μに離型剤に使用されたステアリン酸塩の溶出によるものと見られる吸収が見られる．

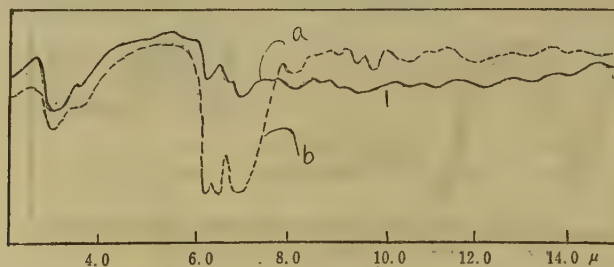



Fig. 6.　a　Phenol-resin
　　　　b　Elution materials from Phenol-resin

塩化ビニール樹脂（厚さ0.015mm，フィルム状）（Fig. 7）．3.44，3.51，7.0μにCH，14.5μにC－Clを示す吸収があり．ポリ塩化ビニールの吸収と比較することによつて5.8，8.9，9.3，13.45μに可そ剤による吸収が見られる．また油脂類に対する溶出試験で豚脂に浸漬した試料は5.8μのC＝O及び8.9～9.3μのエステルの吸収が減少しているのでフタール酸系可そ剤の溶出が考えられた．

$$\left(-\overset{\text{H}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}-\overset{\text{Cl}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}- \right)_n$$

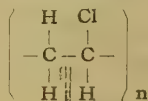
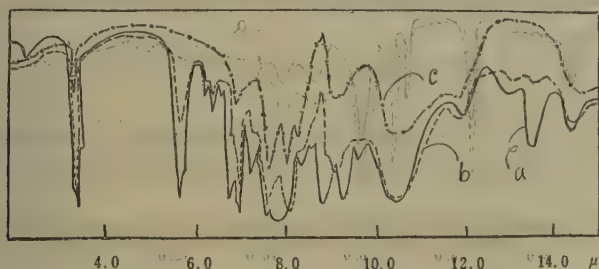



Fig. 7.　a　Polyvinyl chloride film (0.15mm)
　　　　b　Polyvinyl chloride film (dipped in lard)
　　　　c　Polyvinyl chloride

塩化ビニール－塩化ビニリデン共重合体（厚さ0.038mm）（Fig. 8）塩化ビニールの吸収のほか9.38～9.6μにビニリデン基の吸収が見られた．豚脂に浸漬した試料は 5.75，6.64，6.75，7.72，8.45，8.9μ等の可そ剤による吸収の消失はすくないことが判つた．

```
 ( H  Cl  H  Cl  H  )
 ( |   |  |   |  |  )
 (-C - C -C - C -C- )
 ( |   |  |   |  |  )
 ( H  Cl  H   H  H  )n
```

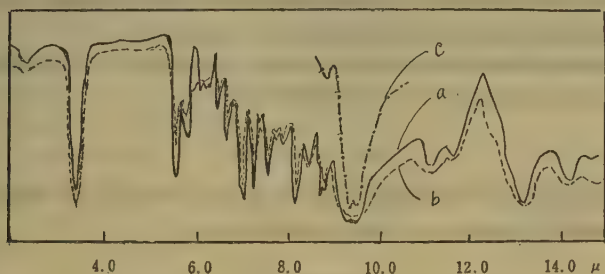
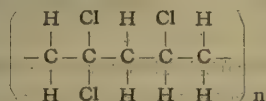



Fig. 8.　a　Vinyl chloride-vinylidene chloride copolymers film (0.038mm)
　　　　b　Vinyl chloride-vinylidene chloride copolymers film (dipped in lard)
　　　　c　Polyvinylidene chloride

塩化ビニール－酢酸ビニール共重合体（Fig. 9）板状の試料を二塩化エチレンに溶解したのち薄膜として測定した（厚さ0.01mm）3.44，5.75，7.0，7.26μ に酢酸ビニールの吸収，80～9.74μ にエーテル結合による吸収，14.5μにC－Cl の吸収が認められ，それぞれの基の吸収によつて 塩化ビニール──酢酸ビニール樹脂を確認することが出来た．

```
 ( H   H   H  Cl )
 ( |   |   |   | )
 (-C - C - C - C-)
 ( |   |   |   | )
 ( H   O   H   H )n
       |
       C=O
       |
       CH3
```

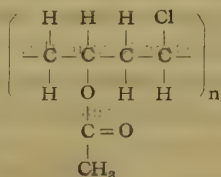
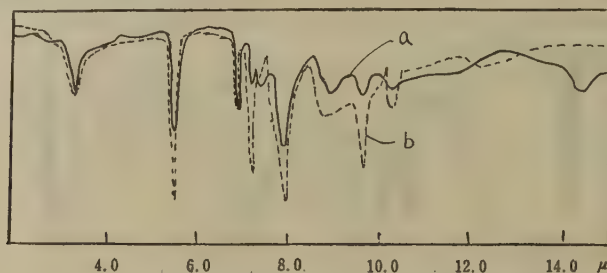



Fig. 9. a Vinyl chloride-vinyl acetate copolymers film (0.01mm)
b Polyvinyl acetate

総　括

(1) ポリエチレン，スチロール及びアクリル樹脂はそのままたは薄膜法を用いてIRを測定し，標準スペクトルと比較して簡易に定性をすることができた．

(2) 尿素，メラミン及びフェノール樹脂はKBr錠剤法を用いてIRを測定した．4％酢酸溶出物については三者中尿素樹脂が最も多く，メラミン樹脂ではメラミンモノマー，フェノール樹脂ではステアリン酸塩の溶出していることが判つた．

(3) ビニール系樹脂では豚脂に浸漬した試料についてIRを測定した結果塩化ビニール樹脂は相当量のフタール酸系可そ剤の溶出が認められ，塩化ビニリデン共重合体では可そ剤の溶出がすくないことが判つた．

以上得られた結果を綜合すると現在市場にある各種合成樹脂製器具をIR分析に処するとき，それぞれ特有の吸収スペクトルを示し樹脂の本質を同定する上に頗る有利であることを知つた．

東京大学工学部綜合試験所のBaird型赤外分光器の使用に際し，種々便宜を与えられた東京大学工学部工業分析化学教室平野教授，田中誠之氏及び小川雅之氏に厚く感謝する．

文　献

1 United States Department of Commerce : Infrared Spectra of Plastics and Resins.
H. Hausdorff : Analysis of Polymers by Infrared Spectroscopy.

Summary

We examined the substantical quality of synthetic resins in Packaging by applying infrared spectra. In general, it is possible to identify an unknown synthetic resin by comparing its infrared spectrum with the standard spectrum of a known material. The sample are treated as follows :

(1) Polyethylen, polyvinyl chloride and its copolymer are applied as thin films.

(2) Polystyrene and acrylic resins (polymethylmetacrylate) as the film-form-solution tecknique.

(3) Urea, melamin and phenol-formaldehyd resins estimated by using KBr Tablet method, those resins boiled with 4% acetic acid, and their extracts were estimated KBr or Nujol method. Uera resin was easier decomposed than others by the above mentioned reagent. Melamine monomer was obtained from the extract of melamne resin and Metalic stearate from that of Phenol resin.

(4) Polvinyl chlorides and vinyl chloride-vinylidene chloride coplymers were dipped in lard at 100 temp for 1hr, and estimated by comparing with the untreated sample. The plasticiser in PVC more dissolved out than the in copolymer.

Received June 18, 1957.

合成樹脂製容器の研究（第2報）尿素樹脂の溶出量について

川城 巖，岡田太郎，細貝祐太郎

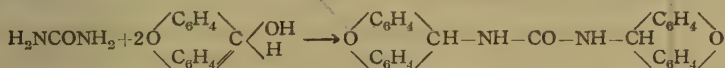
Studies of Packaging in Synthtic Resins (II) Determination of Extracted Materials in Urea Resins

Iwao KAWASHIRO, Tarō OKADA and Yūtarō HOSOGAI

まえがき 飲食に関係ある合成樹脂製の器具及び容器の衛生検査法は食品衛生試験法[1]に採用せられているが，それらのうち食器として最も多く尿素樹脂製が使用されている．尿素樹脂製の器具は，ホルムアルデヒドと尿素を加熱縮合させて製造するのであるが，これらを高温で放置する場合は分解産物としてホルムアルデヒド及び尿素化合物等が遊離することが予想される．特にホルムアルデヒドの場合はその量的関係が衛生的に重要問題となるがこれらについては従来詳細に検討されたことがなかつた．著者等は前報[2]において飲食用容器として使用されている各種合成樹脂について赤外線吸収スペクトルを測定しこれらの定性的鑑別を行なつたがその際尿素樹脂製器具から4％酢酸溶出物としてホルムアルデヒド及び多量の白色蒸発残渣が得られたので一般に食品は酸性の場合が大部分をしめていることを考慮して，4％酢酸のほかに1％クエン酸，3％乳酸及び1％塩酸等の酸性溶液と20％砂糖溶液，3％塩化ナトリウム溶液，3％重炭酸ナトリウム溶液及び15％エタノール溶液等を使用し一定条件で溶出実験を行ない各溶出液中のホルムアルデヒド，全窒素，アンモニア態窒素，尿素態窒素及び蒸発残渣等を定量した．また特に多量の溶出物が予想される4％酢酸等4種の酸類についてはさらにその温度及び放置時間等条件を変えて詳細に検討した．一般に尿素の定量法としてはいろいろの方法があるが特に微量の場合はアゾトメトリー[3]（以下AZMと略記）を応用することが適当と思われる．本法は，尿素に次亜臭素酸ナトリウムNaOBrを作用し酸化分解後，定量的に発生する窒素ガスを測定するミクロのガス分析であるが，NoaOBrは一般的な試薬で例えば尿素のほかアンモニウム塩類をも分解するから

$$H_2NCONH_2+3NaOBr+2NaOH \longrightarrow Na_2CO_3+3NaBr+3H_2O+N_2\uparrow$$

これらを分離定量するためには尿素をキサントヒドロールと反応[4]させ，ジキサントヒドリール尿素として沪別後，沪液について再びNaOBr AZMを行なえばこれらの分離定量が可能であると報告されている．

$$H_2NCONH_2+2O\left\langle\begin{matrix}C_6H_4\\C_6H_4\end{matrix}\right\rangle C\left\langle\begin{matrix}OH\\H\end{matrix}\right. \longrightarrow O\left\langle\begin{matrix}C_6H_4\\C_6H_4\end{matrix}\right\rangle CH-NH-CO-NH-CH\left\langle\begin{matrix}C_6H_4\\C_6H_4\end{matrix}\right\rangle O$$

われわれは本法を応用するために基礎実験として尿素樹脂からの溶出物と考えられるDimethyrol Urea $CO(NH\cdot CH_2OH)_2$，Monomethyrol Urea $H_2NCONH\cdot CH_2OH$，Hexamethylentetramine $C_6H_{12}N_4$及び尿素とホルムアルデヒドとを反応させた初期縮合物（60°C 2 hr.）をそれぞれ合成[5]し，精製後AZMを行なつた結果これらを定量できることを知つたので樹脂溶出物の定量に本法を応用した．一方尿素等と共にその溶出を考えられるホルムアルデヒード[6]の定量はクロモトロプ酸法を用い，標準ホルムアルデヒド液を作成し標準曲線を画いてこれと比較した．蒸発残渣は揮発酸のみについてガラス製蒸発皿を使用して水浴上で蒸発させた．次にこれらの応用例としてわれわれは人工胃液を調製し生体に及ぼす影響を調べる目的で37°の恒温で尿素樹脂製のおわんにあらかじめ調製した人工胃液を入れ24hr.してその溶出実験をも行なつた．

実験の部

(1) 溶出方法．一定濃度の酸液約130ccを成型条件一定の尿素樹脂製のおわんに入れ恒温槽に放置し，一定時間経過後，外に出し室温に冷えるまで放置し検液とした．

(2) AZMによる全窒素の定量．試薬．1.硫酸，飽和K_2SO_4水溶液4容，硫酸1容を混合しこれにブドウ糖を0.3％の割に加えたもの．2.飽和食塩苛性ソーダ溶液．20％苛性ソーダ5容に飽和食塩液2容を混合したもの．操作．

検液1ccを曲径コルベンにとり次いで前記の硫酸2ccを加え加熱分解する．内容液が無色透明になつてからも約20分加熱を続け次いで火を止めて常温に冷却する まで放置する．これに苛性ソーダ食塩液3ccを加えて中和し，基本操作の要領にしたがい内容液を 計内に移しさらに苛性ソーダ食塩液5ccで曲径コルベン内容を洗浄し洗液を計内にとり一定時間CO_2ガスを通じNaOBrによるNaガス発生量から溶出液中の全窒素を定量する．

(3) AZMによるアンモニアの定量．試薬．NaOBr．10N－NaOH20ccに$Br_2$0.5ccを氷冷下に混和し．氷冷の下に保存する．操作．検液1ccを洗液の飽和食塩水7ccと共に計内にとりCO_2ガスを一定時間通じたのち0.5ccのNaOBrを計内にとり充分振盪し分解させNaOBrによるN_2ガス発生量から溶出液中のアンモニア及び尿素を定量する．

(4) AZMによる尿素の定量．試薬．キサントヒドロル試薬．キサントヒドロル0.28を氷酢酸20ccに溶解する．操作．検液1ccにキサントヒドロル試薬1ccを加え約40分放置後，10N－NaOH 1.5cc を加え酢酸を中和し，析出したキサントヒドロル及びジキサントヒドリル 尿素の沈澱を沪過し沪液を計内にとり，洗液とともに計内液を8ccとし常法のごとくAZMを行なつてNaOBr－AZM－N_2を測定しその値をβとするアンモニア定量値αよりキサントヒドロールで固定したのちの沪液の定量値βを知れば，α-βが尿素に対応するN_2ガスの量となる．

(5) ホルムアルデヒドの定量試薬．クロモトロプ酸溶液．クロモトロプ酸0.9gを25ccの蒸留水に溶解し，これに50mgの塩化第一錫を加え充分振盪して透明液とする．ホルムアルデヒド標準曲線の作成[7] ホルムアルデヒド(0.1%) 1ccを蒸留水で1lとする．(ホルムアルデヒド1ppm) 同様にしてホルムアルデヒドの5, 10, 15, 20及び25ppmの標準液を作る．本標準液5ccを100の共栓試験管にとりクロモトロプ酸溶液0.5ccを加え蒸留水で全量を17ccとし，次に氷水で充分に冷却しながら硫酸(98%)で全量を50ccとする．この混合液を100°Cの熱湯中で約10分間加熱し発色後，冷えてから島津光電比色計(DF-1)，フィルター580mμ，キュベット1ccを使用してその吸光度を測定しホルムアルデヒドの検量曲線を作成した．

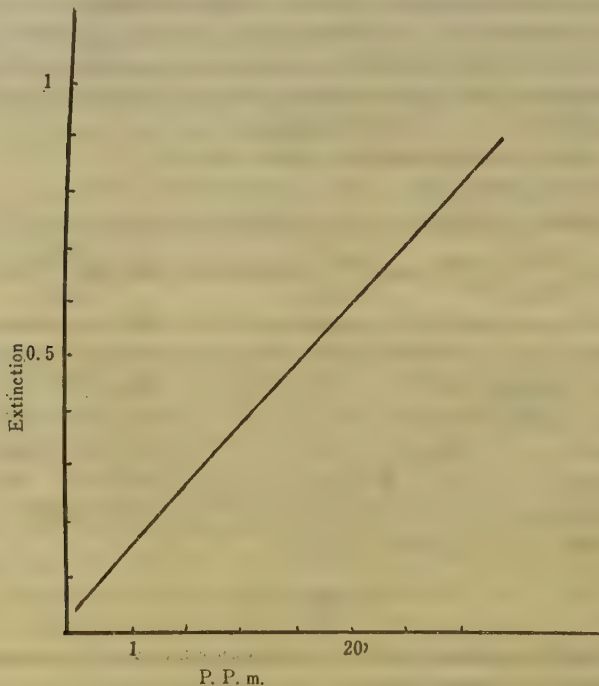



Fig. 1. Calibration Curve of Formaldehyde.

同様に溶出液 5 ccについて，前記と同様に操作して発色させ比色定量を行なつた．

(6) 蒸発残渣の定量．溶出液 50ccをとり硝子製蒸発皿を使用し沸騰水浴上で溶出液を蒸発乾固し，次いで 105°±5° の乾燥器で約 1～2 hr 恒量を得るまで乾燥したのち，デシケータ中に放冷して秤量した．なお硝子製蒸発皿は予め105°±5°で乾燥後使用した．以上の方法に基づいてまず80°，30分において如何なる溶出量を示すかモデル実験を行なつた． 溶出量は第1表の如くである．なお蒸発残渣は揮発酸のみ定量した．また，20% 砂糖液の全窒素の測定は高濃度のため炭素が多くAZM的に分解することができなかつた．また同液のホルムアルデヒド含量の測定も同じく高濃度のためできなかつた．

Table 1. Determination of Urea resins Extracted with Solvent by Heating at 80 temp for 30 min.

Solvent	Total-N	Ammonia-N	Urea-N	Formaldehyd	Evaporatedresidue	PH
Acetic acid, 4 % in water	7.8	2.1	5.5	1.05	24	2.5
Dist. water	6.4	0	0	0.4	0	5.8
Citric acid, 1 % in water	138.0	19.8	98.2	7.4	—	2.5
Sodium bicarbonate, 1 % in water	6.0	0	0	0.18	—	9.1
Sodium chloride, 3 % in water	4.1	0	0	0.18	—	6.4
Sucrose, 20% in water	—	0	0	—		
Lacticacid, 3 % in water	140.0	113.2	8.83	4.0	—	2.2
Alcohol, 15% in water	0	0	0	0	0	
Hydrochloric acid, 1 % in water	932.7	266.0	488.0	76.0	3358	—

Note : Moulding 130～140 temp. 1 min. 150kg/cm² atm. 130cc contents
mg/l (mg per liter of Extracted materials)

以上の結果より見て4種類の酸類はいずれも予想の 如く溶出量が多かつたが，食品衛生試験法 の定める溶出剤の 4 %酢酸では含窒素溶出物が少なかつた． 1 % クエン酸及び 3 % 乳酸の場合は各溶出物もほぼ平均した値を示した．また 1 %塩酸の場合は含窒素溶出物の値に比してホルムアルデヒドの含量が少ないのは，塩酸の存在下ではホルムアルデヒドが揮散するためか定量値は低かつた． 前記4種のいずれの酸類を含む食品の場合でも 尿素樹脂製容器中に高温下で長時間入れて置くことは衛生上悪いことが 前記結果より明らかである． 蒸留水， 3 %重曹及び 3 %食塩の場合は， 樹脂中の含窒素化合物は微量に溶出はするが高分子の状態に止まり尿素態窒素及びアンモニア態窒素等の低分子化合物までには分解しないので， これらの薬品を含む食品を尿素樹脂製容器に入れ て置いてもまず衛生上の問題はないものと思われる． 次にこのような結果に基づいてさらに4種類の酸につ いて さ らに 25°，50°，及び80°における溶出経時間変化を測定した．時間は，10分，30分及び1時間である．成型条件，単位等はいずれもTable 1 と同じ．

この結果をそれぞれ Table 2, 3, 4に示した．以上の結果より 25°では各々の酸も著明な溶出量はない．これが 50°では放置時間が長くなればなる程溶出量を増し， 80° では尿素態窒素及びアンモニア態窒素までに溶 出 さ れる．

Table 2. Determination of Urea Resins Extracted with Solvent.

(Heating at 25 temp for 10 min.)

Solvent	Total-N	Ammona-N	Urea-N	Formaldehyd	Evaporatedresidue
Acetic acid, 4 % in water	1.1	0	0	0	4.0
Citric acid, 1 % in water	3.7	0	0	0	—
Lactic acid, 3 % in water	2.2	0	0	0	—
Hydrochric acid, 1 % in water	5.6	3.3	0	0	76.0
(Heating at 25 temp for 30 min.)					
Acetic acid, 4 % in water	2.2	0	0	0	8.0
Citric acid, 1 % in water	4.4	0	0	0	—
Lactic acid, 3 % in water	4.9	0	0	0	—
Hydrochloric acid, 1 % in water	15.8	9.04	0	1.0	166.0
(Heating at 25 temp for 1 hr.)					
Acetic acid, 4 % in water	4.4	0	0	±	8.0
Citric acid, 1 % in water	7.1	0	0	0	—
Lactic acid, 4 % in water	6.6	0	0	0	—
Hydrochloric acid, 1 % in water	10.3	9.04	0	7.55	6.0

Table 3. Determination of Urea resins Extracted with Solvent.

(Heating at 50 temp for 10 min.)

Solvent	Total-N	Ammonia-N	Urea-N	Formaldehyd	Evaporatedresidue
Acetic acid, 4 % in water	2.7	0	0	0.18	340
Citric acid, 1 % in water	0	0	0	0.18	—
Lactic acid, 3 % in water	2.2	0.5	0	0.2	
Hydrochloric acid, 1 % in water	51.5	17.6	19.4	3.4	100

Solvent	Total-N	Ammonia-N	Urea-N	Formaldehyd	Evaporatedresidue
(Heating at 50 temp for 30 min.)					
Acetic acid, 4% in water	3.8	0.5	0	0.18	460
Citric acid, 1% in water	4.4	3.3	0	0.186	—
Lactic acid, 3% in water	5.5	2.2	0	0.6	—
Hydrochloric acid, 1% in water	60.5	13.0	34	4.1	189
(Heating at 50 temp for 1 hr)					
Acetic acid, 4% in water	4.9	1.1	1.5	0.186	600
Citric acid, 1% in water	10.4	7.7	5.1	1.0	—
Lactic acid, 3% in water	8.8	3.3	0	1.5	—
Hydrochloric acid, 1% in water	357.0	169.0	103.0	8.0	1320

Table 4. Determination of Urea resins Extracted with Solvent.

(Heating at 80 temp for 10 min.)

Solvent	Total-N	Ammonia-N	Urea-N	Formaldehyd	Evaporatedresidue
Acetic acid, 4% in water	4.9	2.5	0	0.7	22
Citric acid, 1% in water	88.1	12.0	66	6.0	—
Lactic acid, 3% in water	18.3	5.5	11.5	5.4	—
Hydrochloric acid 1%in water	370.0	158.0	199.0	37.0	1444
(Heating at 80 temp for 30 min.)					
Acetic acid, 4% in water	7.8	2.1	5.1	1.05	24
Citric acid, 1% in water	138.0	19.8	98.2	7.4	—
Lactic acid, 3% in water	140.0	113.2	8.8	34.0	—
Hydrochloric acid, 1%in water	832.7	266.0	488.0	76.0	3358

Solvent	Total-N	Ammonia-N	Urea-N	Formaldehyd	Evaporatedresidue
(Heating at 80 temp for 1 hr.)					
Acetic acid, 4 % in water	61.6	25.4	31.6	7.8	142
Citric acid, 1 % in water	163.9	81.4	20.4	7.8	—
Lactic acid, 3 % in water	223.7	59.4	110.6	44.0	—
Hydrochloric acid, 1 % in water	1928.3	450.0	642.0	70.0	4986

さらに80°では放置時間30分で4種類のいずれの酸によつても尿素樹脂は溶出されまた放置時間60分では時間が長いためか全窒素溶出量に比してホルムアルデヒド溶出量は大して増加しない．以上の各温度及び各時間における各溶出量の傾向をみると，塩酸溶出によるものが一番溶出量が多くクエン酸及び乳酸は大体同じ溶出量を示すが食品衛生試験法に定めるところの4％酢酸では以上3種類の酸に比して各溶出量が少ないことが判つた．なお成型の条件及び金型の状態，内容量等により溶出量にかなりの差があると思われる．

応用例．これらの基礎資料に基づいて，生体に及ぼす影響を調べる目的で簡単な実験を行なつた．すなわち次の処方の人工胃液[5]を調製し尿素樹脂製のおわんに入れ37°の恒温槽で24hr放置しその溶出量を調べた．なお成型条件等は前と同様．

Table 5. Prescription of Artificial Gastric Juice.

1 % Hydrochloric acid	5cc
Dist. Water	100cc
Pepsine	0.1g

Table 6. Determination of Urea resins Extracted with Artificial Gastric Juice by Heating at 37 temp 24 hrs.

Solvent	Total-N	Ammonia-N	Urea-N	Formaldehyd	Evaporatedresidue
Artificial Gastric Juice	332.2	125.0	189.0	—	—

このように相当量の溶出がありこれらの物質を誤つて飲んだ場合に生体に若干の影響が以上の結果よりあるものと思われる．なおホルムアルデヒド溶出量は発色時に硫酸を使用しペプトン等が処方中にあるので呈色に障害があり測定できなかつたがその溶出量は含窒素化合物の溶出量よりみて相当量溶出しているものと思われる．蒸発残渣の成分，各種の酸溶出物質は白色の粉末で，その成分は Urea，Monomethyrol-Urea，Dimethyrol-Urea，Hexamethylentetramine 及びこれらの縮合物と思われるが，浜田[5]の報告に基づいて沪紙クロマトグラフィーによりこれらの成分の確認を行なつているがその詳細はなお研究中である．

総　括

各種食品中に含有される成分と同じ，酸類を使用して尿素樹脂製容器の溶出実験を行ない，塩酸，クエン酸，乳酸及び酢酸の順で溶出量が多いことが判つた．これらの結果から前記酸類を含む食品を尿素樹脂製容器に入れて高温度に長時間放置し，その内容物を飲食することは衛生上良くないことと思われる．

文　　献

1) 昭和23年12月厚生省告示第106号
2) 川城，岡田，大場：本誌，75，239 (1957).
3) 岩崎：生化学 23.(4)，31 (1951).
4) R. F. Phillips and B. M. Pitt : *J. A. C. S.*, 65, 1355 (1943).
5) 浜田：工化., 58 (4), 286 (1955).
6) Boyden : *J. B. C.*, 146, 279 (1942).
7) JIS : S. 9017 (1957).
8) 須藤：小区化学実験法 69 (1951).

Summary

Some Components of the eluate which is eluted from the Urea-Formaldehyde resins by Dist. Water, Acetic acid 4% in water, Citric acid 1% in water, Lactic acjd 3% in water, Hydrochloric acid 1% in water, Sodium bicarbonate 3% in water, Sdium chloride 3% in water, Sucrose 20% in water, alcohol 15% in water and Artificial Gastric Juice respectively, were determined. For the microdetermination of total-Nitrogen, uera-Nitrogen and ammonia-Nitrogen, the Azotometry method was avdilable. For the determinatec liberated formaldehyde, A 20mol aliquot of elution extracts is treated with 1cc of chromotropic acid corresponding to this results is obtained from a Curve previously determined from standard formaldehyde solutions and here following results :

Table 1. Determination of Urea resins Extracted with Solvent by Heating at 80 temp for 30 min.

Solvent	Total-N	Ammonia-N	Urea-N	Formaldehyde	Evaporatedresidue	PH
Acetic acid, 4% in water	7.8	2.1	5.5	1.05	24	2.5
Dist. Water	6.4	0	0	0.4	0	5.8
Citric acid, 1% in water	138.0	19.8	98.2	7.4	—	2.5
Sodium bicarbonate, 1% in water	6.0	0	0	0.18	—	9.1
Sodium chloride, 3% in water	4.1	0	0	0.18	—	6.4
Sucrose, 20% in water	—	0	0	—	—	—
Lactic acid, 3% in water	140.0	113.2	8.8	34.0	—	2.2
Alcohol, 15% in water	0	0	0	0	0	—
Hydrochloric acid, 1% in water	932.7	266.0	488.0	76.0	3358	

Note : Moulding 130～140 temp. 1 min. 150kg/cm^2 atm. 130cc contents.

mg/l (mg per liter of Extracted materials)

Received June 18, 1957.

銀錫アマルガム合金の硬化膨縮について（第３報）
銀錫アマルガムの異常膨脹について

藤 井 正 道，堀 部 　隆

Studies on Dimensional Change of Dental Amalgam Alloy. III.
Studies on Excessive Expansion of Dental Amalgam Alloy.

Masamichi FUJII and Takashi HORIBE

まえがき　銀錫アマルガムの汚染による異常膨脹，変形，発泡，強度の低下及び歯髄炎の発生については今日まで種々研究され報告されている．(Black[1]，Romnes[2]，Skinner[3]，Healey[4]，Schoonover[5])

しかし国産品銀錫アマルガムについての研究報告はあまりされていないので，著者等は国産銀錫アマルガムについて各種汚染を行ない，空気マイクロメーターにより異常膨脹を測定する[6]と共に，電気抵抗をも測定して遷延膨脹（Delayed expansion）の原因を研究した．

実 験 の 部

（１）**実験材料**　本実験に使用した市販銀錫アマルガム合金はＡ，Ｂ，Ｃ社製品で，ＡＢは含亜鉛アマルガムＣは無亜鉛アマルガムで，その組成は第１表の如きものである．

Table I. Chemical Composition of Dental Amalgam Alloys.

Sample	Ag (%)	Sn (%)	Cu (%)	Zn (%)
A	69.75	25.62	3.25	1.38
B	69.13	26.86	3.01	0.95
C	69.09	27.49	3.42	—

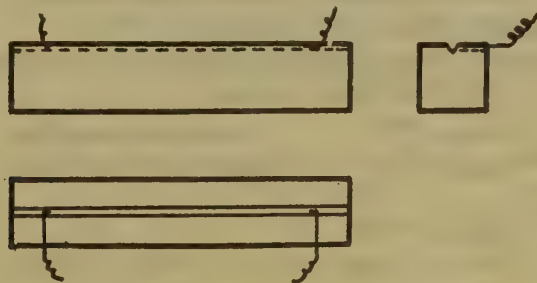



Fig. 1 Resin Mould

又水銀は前報[8]と同じく精製したものを使用した．

なおアマルガム合金粉末は使用前あらかじめ乾燥器中で乾燥した．

（２）**実験装置**　硬化膨縮測定：空気マイクロメーター，破砕抗力測定：アムスラー型抗張力試験機，加圧変形測定：加圧変形測定装置，電気抵抗測定：金属細線抵抗計（歪計）新興通信工業ＫＫ製 PS-7L 型，電気抵抗測定用型：Fig. 1 に示す如くアクリル樹脂製．

（３）**汚染の方法**　（Ａ）汚染液：(イ)を除いて蒸留水，１％食塩溶液，オリーブ油をそれぞれ合金粉末2.5～3ｇ

に対し1～3滴の割で添加した．

（B） 汚染方法　(イ)　汗による汚染，硝子製乳鉢中で規準により練和したアマルガム泥を掌中で1分間100回捲回練和し，汗で汚染した．

(ロ)　乳鉢中で規準[7]により練和したアマルガム泥をゴム膜中にとり，汚染液を添加し，1分間100回捲回練和した．

(ハ)　規準により練和過剰の水銀を搾出後金型に充塡，直ちに型より取り出した硬化初期のアマルガムを1分間1％食塩水に全漬した後引上げる．

(ニ)　(ハ)と同様取出した硬化初期のアマルガムをFig. 2の如く蒸留水に半漬する．

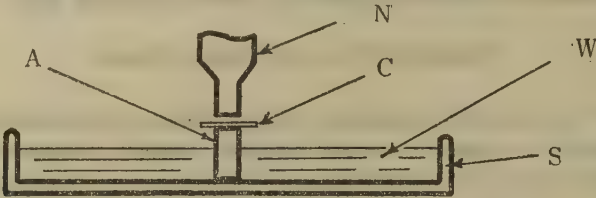



Fig. 2.　Continuous Semi-dipped in Water of an Amalgam.

A : Amalgam Specimen　　N : Air Micrometer nozzele
C : Cover glass　　S : Glass dish
W : Water

（C） 試験片の寸法，練和，過剰水銀の搾出及び充塡方法 第2報[8]と同じ要領で行つた．但し電気抵抗測定用試験片の充塡はFig. 1の如き型の三角溝中にアマルガム充塡器の背部を使用し，可及的均一に充塡した．

（4） 膨縮および電気抵抗測定

（A）膨縮測定　(3)の（B）の前述の操作により汚染したアマルガム試験片（直径6 mm高さ10mm）を空気マイクロメーターにSetし，時間と共に膨縮（μ/cm）を測定し，時間－硬化膨縮曲線を画いた．

（B） 電気抵抗測定　金属細線抵抗計を使用し型に充塡せるアマルガムを交流1500 Cycleを用い電気抵抗変化率（$\Delta R/R$）を測定し，時間－電気抵抗変化率曲線を画いた．

実験方法および実験結果

(1) 試　料　A，B，Cを(3)の（B）(イ)の操作により著者等が各々掌中で練和汚染し，アマルガム充塡器で充塡を行つた試験片につき硬化膨縮及び破砕抗力を測定した結果は次の如くである．

Table II.　Effect of Variation in Contamination on Physical Properties of Dental Amalgams.

Sample	Contamination	Packing Method	Powder / mercury	Dimensional Change μ/cm						Crushing st. kg/cm²	Flow %
				1 day	2 days	3 days	4 days	5 days			
A	Hand mulling operator H	Hand pressure	1 : 1.04	1.1	1.3	1.9	2.6	—	—	2595	—
〃	〃 〃 F	〃	1 : 1.08	−2.7	—	−2.4	—	−2.4	6 days −2.0	2503	4.9
〃	〃 〃 T	〃	1 : 1.08	2.6	3.4	—	—	7.0	30days 33.9	2204	—
B	Non Contamination	〃	1 : 1	3.4	—	4.1	4.4	—	—	2520	—
〃	Hand mulling operator H	〃	〃	5.5	5.7	5.9	—	—	—	2520	—
〃	〃 〃 T	〃	〃	7.1	—	7.8	9.3	10.4	—	2165	—
C	〃 〃 H	〃	〃	−5.1	−5.4	−5.4	−5.7	—	8 days −6.1	2265	—
〃	〃 〃 T	〃	〃	−4.2	−4.6	−4.9	−5.1	—	6 days 6.6	—	—

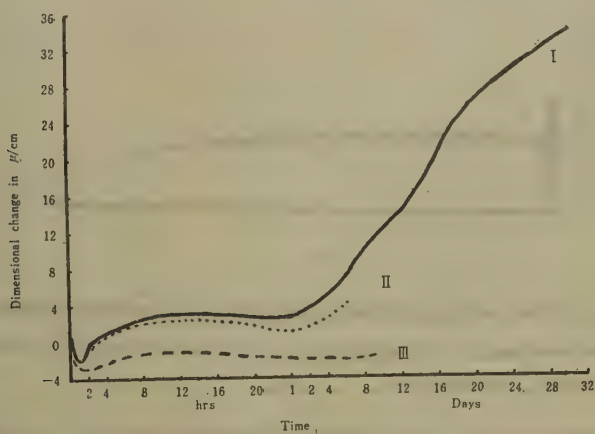



Fig. 3. Effect of Variation in Contamination on Dimensional Change.

I. Zinc amalgam A was contaminated during its manipulation. (Operator, T)

II. Manipulation (Operator, H)

III. Manipulation (Operator, F)

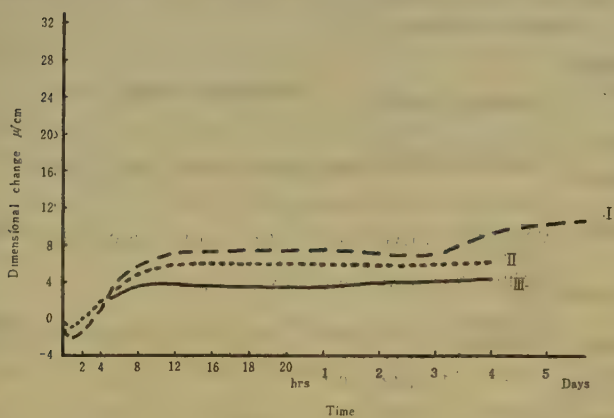



Fig. 4. Effect of Variation in Contamination on Dimensional Change.

I. Zinc amalgam B was contaminated during its manipulation. (Operator, T)

II. Manipulation. (Operator, H)

III. Manipulation. (Operator, F)

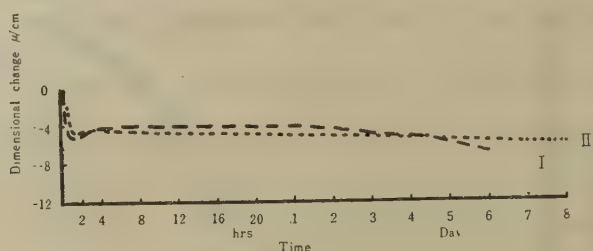



Fig. 5. Effect of Variation in Contamination on Dimensional Change.

Ⅰ. Non-zinc amalgam C was contaminated during its manipulation. (Operator, T)

Ⅱ. Manipulation. (Operator, H)

上の結果によれば含亜鉛アマルガムA，Bは1日以内には余り個人差を認めないが，2日以後にTの汚染せるものは他に比較して急激に異常膨脹し，特に試料Aはこの傾向が著しい．(1ヵ月+33.9μ) 無亜鉛アマルガムCにおいてはT，Hの汚染せるものは共に余り差が認められず又異常膨脹も起らない．又破砕抗力も異常膨脹を起したものは弱い傾向が認められた．

(2) 試料A，C，を(3)の(B)(ロ)の操作により練和時に水，1％食塩水，オリーブ油を添加汚し染 Hollenback 氏考案のPneumatic Condenserで充塡した試験片につき硬化膨縮，破砕抗力，加圧変形を測定した結果は次の如くである．

Table Ⅲ. Effect of Variation in Contamination on Physical Properties of Dental Amalgams.

Sample	Contaminative method Powder / Mercury / Contaminative liquid	Packing method	Powder / mercury	Dimensional Change μ/cm						Crushing st. kg/cm²	Flow %
				1 day	2 days	3 days	4 days	5 days			
A	Non Contamination	Pneumatic Condenser	1 : 1.06	−4.7	−4.8	−4.9	−5.0	5.0	22days 0	—	—
〃	Water 1 : 1.01 : 0.032	3000lb/□〃 press.	1 : 1.01	−2.0	−1.7	0.9	1.0	—	—	2490	2.6
〃	1％NaCl 1 : 1.18:0.007	Pneumatic Condenser	1 : 1.18	+0.9	3.8	8.7	13.2	17.0	7 days 23.9	—	—
〃	olive oil 1 : 1.23 : 0.0044	〃	1 : 1.23	−0.9	—	—	−1.0	—	—	2722	3.9
C	Non Contamination	Hand pressure	1 : 1	−7.1	−7.2	—	−7.3	—	—	—	1.4
〃	1％NaCl 1 : 1 : 0.0055	〃	1 : 1	−2.9	−3.0	—	−3.2	—	—	—	3.7
A	Non-Contamination	Amalgam press 3000lb/□〃	—	−3.2	−3.3	−3.5	−3.5	—	—	—	—
〃	Semi-dipped in water	〃	—	4.7	4.8	—	4.9	—	—	—	—
〃	dipped in 1％ NaCl one minute	〃	—	6.4	6.2	—	5.8	—	—	—	—

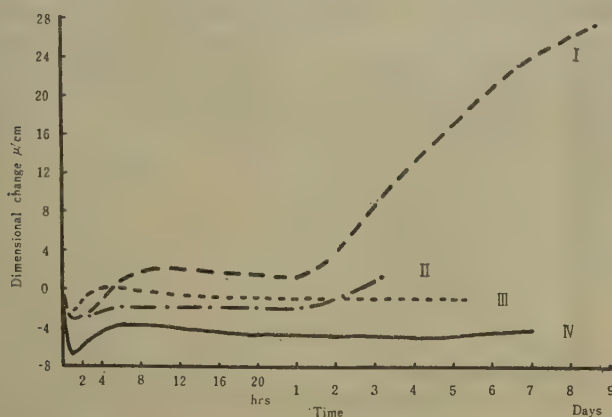



Fig. 6. Effect of Variation in Contamination on Dimensional Change.

I. Contaminating Zinc amalgam A in 1% Sodium chloride soln., and condensed with hand pressure.

II. Contaminated in water

III. Contaminated in olive oil.

IV. Non-Contaminated and condensed with pneumatic condenser.

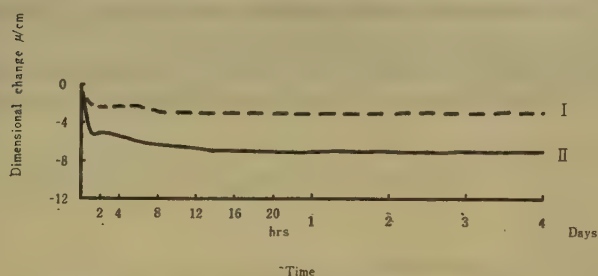



Fig. 7. Effect of Variation in Contamination on Dimensional Change.

I. Contaminating Non-zinc amalgam C in 1% Sodium chloride soln., and condensed with pneumatic condenser.

II. Non-Contaminated and condensed with pneumatic condenser.

又Fig. 6の一部1%食塩水で汚染せるアマルガムの異常膨脹を長期に亘り測定した結果はFig. 8の如くである.

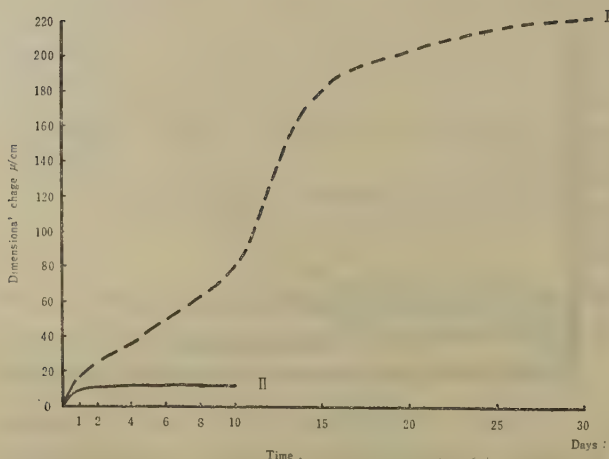



Fig. 8. Long-term Delayed Expansion of a Zinc Amalgam.

I. Contaminating Zinc amalgam A in 1% Sodium chloride soln., and condensed with Pneumatic condenser.

II. Non-contamination, and condensed with pneumatic condenser.

以上の結果によればAは1日以内では各種の汚染アマルガムは余り差がないが，1日以後は1%食塩汚染のものは 4 μ/day の割合で異常膨脹を起し，1ヵ月後には約220μ の大なる膨脹が認められ，又水による汚染のものも異常膨脹が認められた．オリーブ油汚染のものは特に異常膨脹は認められなかつた．Cは1%食塩水汚染のものが汚染せぬものに比較して約2μ収縮が少いのみで異常膨脹を認め得なかつた．

(3)　試料Aを(3)のB(ハ)(ニ)の操作により練和充塡（充塡圧 3000lb/□″）せる硬化初期のアマルガムを1%食塩水中に1分間全漬後取出し，又は水中に継続半漬した試験片につき硬化膨縮を測定した結果はTableIII，Fig. 9の如くである．

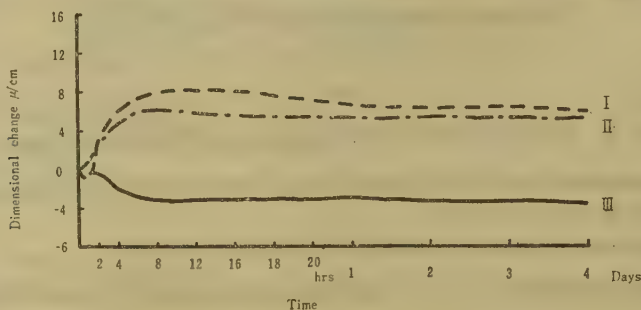



Fig. 9. Effect of Variation in Contamination on Dimensional Change.

I. Zinc amalgam A in early hardening time was contaminated by dipped in 1% Sodium chloride soln. One minutes.

II. Continuous Contaminated by Semi-dipped in water.

III. Non-Contaminated and condensed under pressure 3000 lb/□″

右の結果によれば両者共に 練和開始後７時間位迄膨脹を示すが，以後漸次収縮を示し，１日後には汚染せぬ試験片より 8～9 μ膨脹を示し，以後余り変化は無い事が認められた．又１％食塩水１分間全漬の試験片が水に常時半漬の試験片より１μ程度膨脹が大きい事が認められた．

(4)　試料Ａを(3)の(Ｂ)(ロ)の操作により１％食塩水，油の各種汚染を行なつた試料につき Pneumatic Condenser を以つて機械的充塡を行ない異常膨脹を抑制が可能かを測定した結果は TableⅢ，Fig. 10 の如くである．

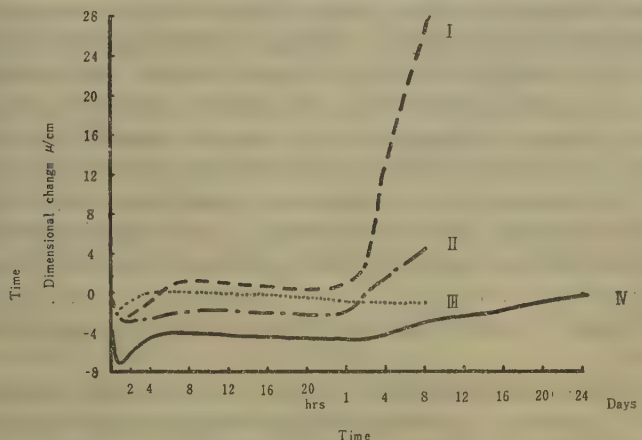



Fig. 10.　Control to Excessive Expansion of Contaminating Amalgam by Mechanical Condensation.

Ⅰ. Contaminating Zinc amalgam A in 1％ Sodium chloride Soln., and Condensed with Pneumatic Condenser.　Ⅱ. Contaminated in water.　Ⅲ. Contaminated in olive oil.
Ⅳ. non-Contaminated and Condensed with Pneumatic Condenser.

右の結果によれば１％ 食塩水汚染のものは１日以後約４μ/day の割合で異常膨脹を起し，又は水の汚染のものも異常膨脹を起している．従つてPneumatic Condenser でもつてしても異常膨脹を抑制する事は不可能である事を示している．

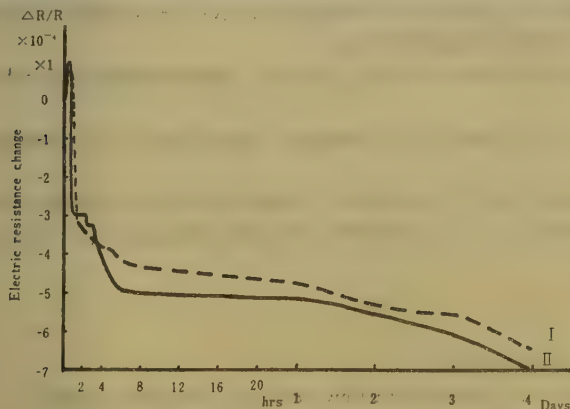
(5)　試料 Ａを(3)の(Ｂ)(ロ)の操作により１％食塩水汚染を行なつたものと汚染を行わぬものは電気抵抗測定用レジン製型に充塡し，電気抵抗変化率を測定した結果は Fig. 11 の如くである．

Ⅰ. Contaminating Zinc amalgam A in 1％ Sodium chloride Soln.,and condensed with hand pressure.
Ⅱ. non-Contaminated and condensed with hand pressure.

Fig. 11.　Effect of Variation in Contamination on Electric Resistance Change.

上の結果によれば１％食塩水汚染の試験片と汚染せぬ試験片の電気抵抗変化率は余り変らない事が観察された．

考　　察

国産アマルガムの汚染による遷延膨脹はSchoonover等[5]の実験によれば含亜鉛銀錫アマルガム合金が，練和中水分が混入すると，アマルガム成分（Ag－Hg．Sn－Hg．Cu－Hg．Zn－Hg）中のZn－Hgが水と反応し水素ガスを生じ，これが合金内部に残留し１～５日後に膨脹となつて現われるとされている．Fig. 3，Fig. 4においてTの汗の汚染によりFig. 3の膨脹がFig. 4のそれより大なのはTable 1に分る如くZnの含量の多少のため汚染により生じた水素ガスの容積の多少が原因と思われる．又個人差により異常膨脹に差異があるのは主として掌中皮膚の汗の量の差異によるものと思われる．Fig. 6において食塩水による汚染が，水による汚染より異常膨脹の多いのは，水に電解質（食塩）が溶解するためZn－Hgとより反応速度が早まり水素ガス発生が促進されるためであろう．又オリーブ油による汚染により異常膨脹を起さぬのは，有機物のため解離せず，Zn－Hgとの反応がほとんどないためと思われる．Fig. 8において14日以降において異常膨脹が減衰するのは，亜鉛及び水の量が一定限度があるためと思われ，更に長期の測定を行なえば異常膨脹の停止点も観測し得ると思われる．Fig. 9において異常膨脹が起らぬのは，硬化初期に外部より水又は食塩水で汚染しても，水又は食塩は外部のみで内部に滲透拡散せず，従つてZn－Hgとの反応量も少いため膨脹も初期で完了し，異常膨脹として起らないようである．又無亜鉛アマルガムの各種汚染を行なつた結果，Fig. 5，Fig. 7において異常膨脹が起らないのは，銀－水銀，錫－水銀，銅－水銀のみで，37°の温度にてこれら成分の電位が高く，水と反応しやすい亜鉛－水銀がないために異常膨脹が起りにくいのであろう．

Fig. 10において，Pneumatic Condenserが前報[8]に述べた如く反応すべき水銀の一部を溢出し，そのため収縮を伴う現象が起るが，これを利用して水及び食塩水の汚染による異常膨脹を抑制せんとしたが抑制出来なかつた．これは汚染がFig. 11の実験結果で明らかな様に相変化による膨脹でなく，化学的変化による水素発生のための膨脹であるため，機械的充塡方法の改善では抑制は不可能と思われる．

Fig. 11で１％食塩溶液で汚染のアマルガムが，汚染せぬアマルガムとほとんど抵抗変化率が並行である．これは両者共相変化による硬化膨脹の電気抵抗が変化したもので，汚染により電気抵抗は特に変化しない．換言すれば，汚染による物理的変化（相変化）は起らず．化学的変化のみが異常膨脹に関係するのであろう．

総　　括

(1) 含亜鉛アマルガムを掌中で練和し，汗で汚染したアマルガムは異常膨脹を起すが，その量は練和者の汗の多少により異る．

(2) 含亜鉛アマルガムは練和に汗，食塩，水等の混入により汚染され，異常膨脹を起すが，無亜鉛アマルガムは起さない．又含亜鉛アマルガムは油の混入により汚染されず，異常膨脹も起さない．練和充塡後水又は食塩水に浸漬しても反応を起さず，硬化後外部より汚染は異常膨脹を起さない．

(3) 異常膨脹の原因は，水とアマルガム成分中の亜鉛との反応によるもので，食塩等の電解質の添加は特にその反応を促進する．

(4) 含亜鉛アマルガムの水，食塩水又は汗にて汚染せるものの異常膨脹は，機械的充塡によつても抑制出来ない。

(5) 硬化中のアマルガムの電気抵抗を測定した結果，汚染せぬものと．汚染せるものとほとんど差異を認めず．汚染による異常膨脹の原因は，主として化学的反応によるもので物理的（相）変化ではないもののようである．

文　　献

1) Black. G. V.：D. Cosmos, 38, 965 Dec (1896).
2) Rommes. A. F., and Skinner. E. W.：Northwestern Univ. Bull., 38, 19－22 Feb (1938).
3) Skinner. E. W.：The Science of Dental Materials.
4) Healey. H. J., and Phillips. R. W.：J. Dent. Res., 28, 439－446 Oct (1949).

5) Schoonover. I. C., Wilmer Souder, and Beal J. R. : J. A. D. A., 29, 1825 Oct (1942).
6) 藤井，堀部，亀田：本誌，72，295 (1954).
7) 日本歯科材料協会規格，第１号.
8) 藤井正道，堀部隆：本誌，74，189 (1956).

Summary

We have been investigated the effects of variations on contaminative methods, dimensional changes (excessive expansion), flow, crusing strength and electric resistance changes were obtained using air micrometer and the other apparatus in commercial Dental Amalgam Alloys.

The results were as follows :

(1) The amount of contaminating zinc amalgam alloys excessive expansion in seat, that depended on quantity of seat in palm of operator.

(2) Contaminating zinc amalgam alloys in seat, water and sodium chloride etc., that occured excessive expansion, but were not occured only in oil. And non-zinc amalgam alloy were not occurred by all contaminations.

(3) Zinc amalgam alloy in early hardening time were contaminated by dipped in water or sodium chloride solution, that were not occured excessive expansion.

(4) Excessive expansion of zinc amalgam alloys were contaminated in water, seat and sodium chloride solution that ware uncontrollable by mechanical condensation.

(5) The cause of excessive expansion were depend on the react to water and the ingredients of amalgam (especially zinc). And this reaction were accelarated by adding electrolytes. (for example, sodium chloride)

(6) The results of measured to electric resistance change on setting two type amalgams that one contaminated, the other not contaminated were not different conditions. It seems that the cause of excessive expansion by the contamination were chiefly chemical reactions, but physical changes (phase change).

Received June 18, 1957.

腸線の改良に関する研究

藤井正道，辻　楠雄，薩摩義一郎*

Studies on the Improvement of the "Catgut".

Masamichi FUJII, Kusuo TSUJI, and Giichirō SATSUMA

まえがき　腸線は健康な羊，牛，馬および豚等の小腸の漿膜を加工して作製されるが，その中でも羊の小腸が最上とされている．しかし本邦においては，現在その原料が得難いので主として馬の小腸がもちいられている．

著者等は腸線に対するU．S．PとJ．I．Sにおいて，特に引張り強さにおいて相違があり．J．I．Sの方が低く規定されている事については原料が米国においては羊腸が使用されるためと考えてきたのであるが，その事に対して疑問をもつにいたり，たとえ代用腸線である馬の小腸をもつて引張り強さの充分出る様に考え研究を行つた結果，この工程中脱脂漂白の化学的処理は引張り強さに重要な影響があることがわかつたのでここに報告する．

実験の部

実験材料　馬の小腸をもちい，漿膜は小腸の内部の粘膜を除去し縦に開き，塩漬されているのでよく水洗し，腸毛や，斑点，いぼ，汚染，破れ等の諸欠点を取り除く．

試料は巾約8mmとし，全て一本撚りにして測定した．

試験機は20kgショッパー氏抗張力試験機（感度100g）をもちいた．

脱　脂　脱脂は0.3%過酸化ナトリウムをもちい，脱脂時間と引張り強さの関係について測定した．

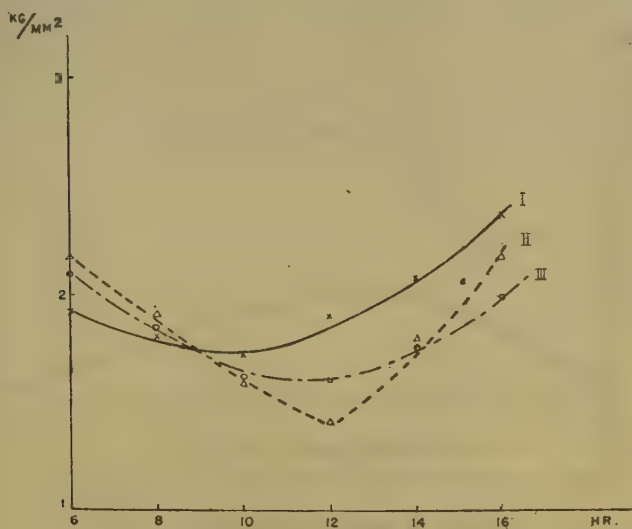



Fig. 1.　Effect of variation of defatting times on tensile strength.

I. Sample No. 1.,　II. Sample No. 2.,　III. Sample No. 3.

*　所員外

漂　白　漂白は脱脂処理の終つた試料に３％過酸化水素水，３％硅酸ナトリウムと，0.8％硫酸マグネシウムの混合液をつくり，これを漂白液として，おのおの異つたの脱脂処理時間に対する漂白時間と引張り強さとの関係を次に示す．（Fig. 2～7）

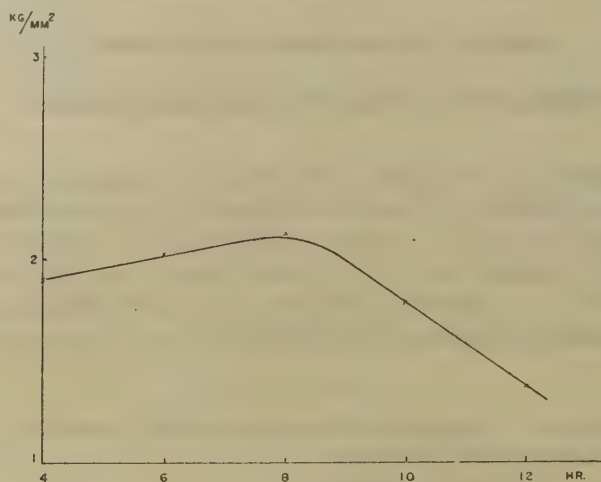



Fig. 2. Defatting times 6 hr.

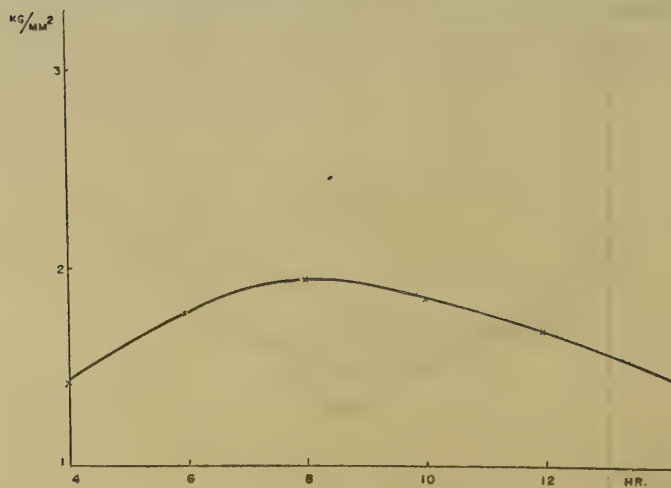



Fig. 3. Defatting times 8 hr.

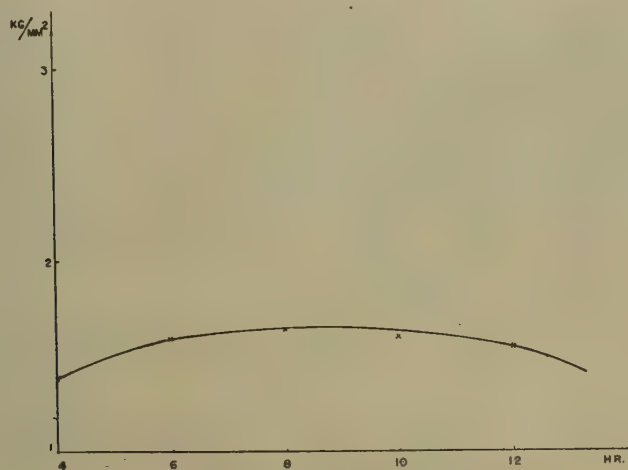



Fig. 4. Defatting times 10hr.

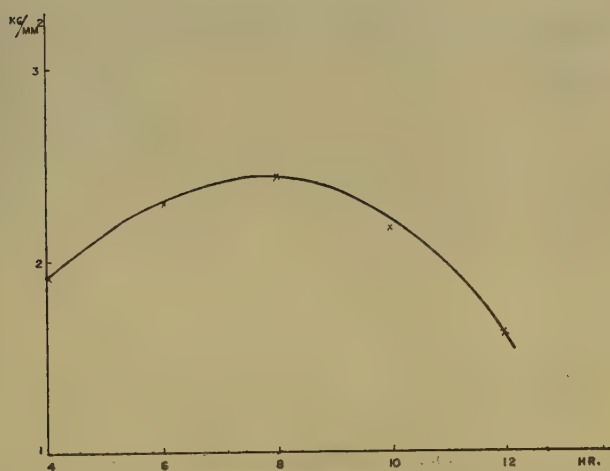



Fig. 5. Defatting times 12hr.

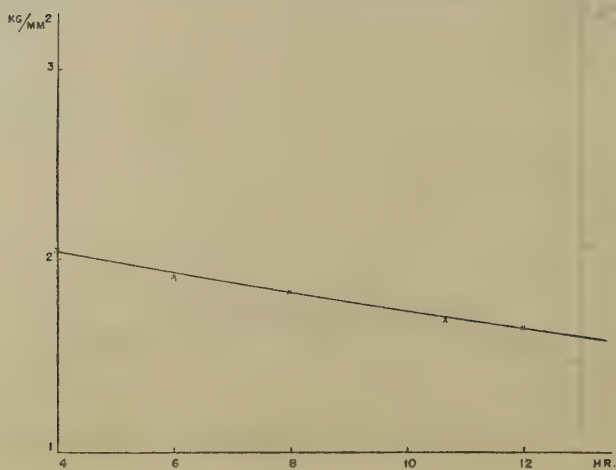



Fig. 6. Defatting times 14hr.

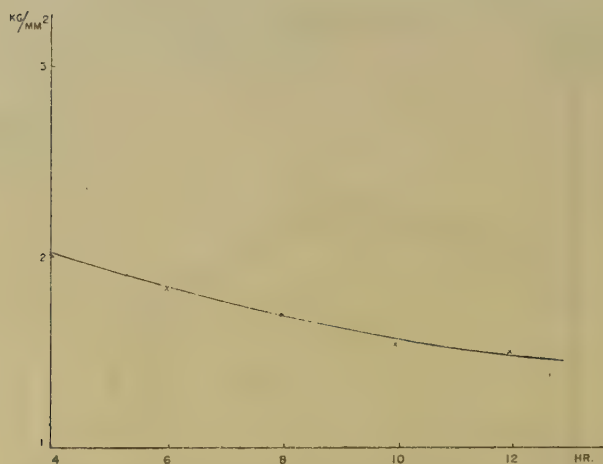



Fig. 7. Defatting times 16hr.

Effect of variation of decolourizing on tensile strength of the 6, 8, 10, 12, 14 and 16 houres defatting horse lectum.

クロミック加工　クロミック加工されたものは一般にプレインよりも弱いとされているので．前記と同一の方法で行なつた．（Fig. 8）

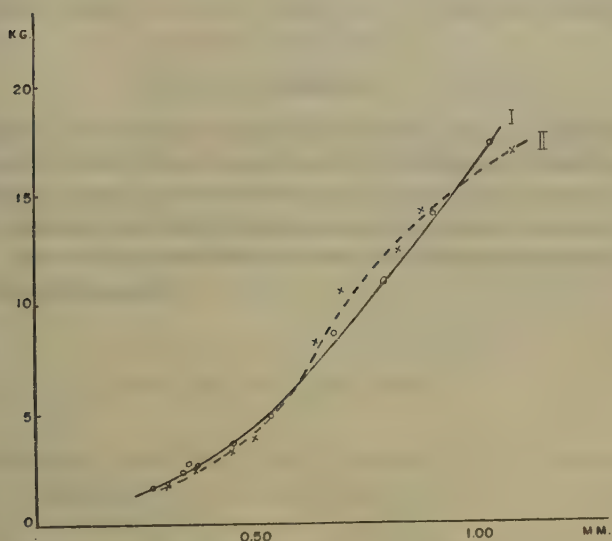



Fig. 8. Comparison of tensile strength of plaine catgut and chromic catgut.

I. Plaine catgut. II. Chromic catgut.

総　　括

1. 脱　脂　脱脂時間は一般に浸漬時間が長い程弱い様に考えられるが16hr以内においては10～12hrがもつとも弱いことも判明した．（Fig. 1）

2. 漂　白　漂白も脱脂同様長い程弱い様であるが，Fig. 2～5 をみてわかる様に 8 hr で最大値がみられ，Fig. 6～7 において始めて漂白時間に比例して弱くなつている．

このことは脱脂では 8～10hr で最小がみられ漂白では 8 hr 附近で最大となるので，2つの化学的処理によつて引張り強さが相殺され，脱脂 8 hr漂白 12hr においてもつとも強いとおもわれるのでその方法により作製し測定したところ，以前の製品に比較して良好な製品をうることが出来た．（Fig. 9）

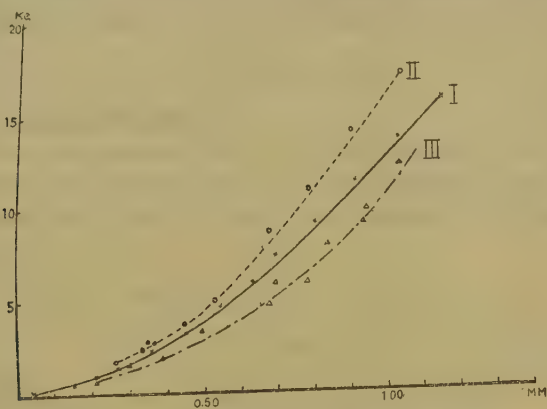



Fig. 9. Tensile strength curves of improved, not improved catgut and specification of U S P

I. U S P. II. improved catgut. III. not improved catgut.

又クロミック加工されたものは一般にプレインよりも弱いとされていたが，測定した結果大した差はみられなかつた。

Summary

During and after World war II, the importation of Sheep lectum from China was stopped. The raw material of the home-product catgut is not the sheep lectum but the horse lectum.

Furthermore, on account of poor method the properties of the home-product was inferior to the gebuine catgut. But we discovered according to proper degrees of defat and decolourize, the properties of the product made from horse lectum are good pass the speficication of U.S. P VX.

Received June 18, 1957.

衛生材料の研究（第5報）
人造繊維類の確認並びに定量試験

喜谷 市郎右衛門，中島辰巳，伊藤酉一，遠藤 勝

Studies on Surgical Dressings. V. Identification and Determination of the Artificial Fibers (the Synthetic Fibers).

Ichirōemon Kidani, Tatsumi Nakashima, Yūichi Itō, and Masaru Endō

まえがき　最近衛生材料中に人造繊維類の混入がしばしば認められる．J. P. VI. には基源中に“*Gossypium hirsutum* Linné 又は同属諸種植物（*Malvaceae*）の栽培変種の毛”と記載し，J. P. V. ではヨードエオジンによる試験法が明記されて，スフの混入を禁止している．

天然繊維及び人造繊維類の識別法には燃焼法，溶解法，呈色法，染色法等数多[1]あり，各々その長所を有しているが，鋭敏なものは一般に煩雑な手数を要する．J. P. V. の精製脱脂綿の項に記載されているヨードエオジンによるスフの検出法は，染色されたスフの色が淡桃色でそれ等が少量しか混入していない場合には非常に検出し難く，かつビスコース・スフ以外の人造繊維は染色しない．

著者等は尾川氏法[2]を多少改良し，濃ヨウ素試液を用いて試みたところ，非常に簡便でしかも明確に人造繊維類を検出し得た．

次に木綿繊維は60％硫酸に難溶であるが，スフやその他の人造繊維類は本液に易溶であり，その処理液にヨウ素試液（J. P. VI.）を加えると特有の呈色をする．スフやビニロン等の混入する脱脂綿に本法を用いて呈色させ，その混入率を，およそ判定し得た．

脱脂綿中に混入する人造繊維類の定量法は，それ等繊維類が60％硫酸又は20％塩酸に易溶であり，木綿繊維が難溶である性質を利用し重量法による定量を試みた．

今回 J. P. VI. 追補6（昭和31年12月25日公布）に脱脂綿中の異物の検出法として収載された濃ヨウ素試液法は，本研究を基礎として編集されたものである．よつてここに報告する．

実験の部

I. 濃ヨウ素試液による人造繊維類の確認法

試　液：ヨウ化カリウム100gを水100ccに溶かし，これにヨウ素20gを加え，溶けるまでかきまぜる．

操　作：内容約20ccの小ビーカ中に試料を約0.1g入れ，濃ヨウ素試液を加えてガラス棒で圧し，充分に試料を浸漬させる．1分間浸漬した後，流水で充分に水洗すると木綿繊維は直ちに褪色し白色となるが，人造繊維は Table 1 の様に着色する．

Table 1. Coloration of Various with conc. Iodine T.S.

	immediately after	2 hours after
Cotton	colorless	colorless
Unripe Cotton	light brownish violet	colorless
Hemp	brownish black	yellowish brown
Straw	indigo	yellowish indigo

	immediately after	2 hours after
Viscose Rayon	blackish indigo	indigo
Benberg Rayon	grey	grey
Acetate Rayon	brownish black	yellowish brown
Vinylon	black	black
Nylon	black	brownish violet
Amylan	black	brownish violet

II. 60%硫酸処理後ヨウ素試液による呈色法

0.5%，1%，5%，10%のビスコース・スフ及びビニロンを混入する脱脂綿1gを60%硫酸50ccの中にそれぞれ浸漬し，ガラス棒で攪拌する．30分後にその浸液5ccをとり，ヨウ素試液（J. P. Ⅵ.）3滴を滴下すると第2表に見られる様な呈色を見た．

Table 2. Coloration of other Fibers in Cotton with 60%—H_2SO_4—Iodine T.S.

Other Fiber mixed	Rate mixed %	immediately after	1 hour after	12hours after
Viscose Rayon	0	yellow	yellowish green	light violet
	0.5	light green	bluish green	indigo
	1.0	blue	indigo	ingigo
	5.0	indigo	indigo	indigo
	10.0	indigo	indigo	indigo
Vinylon	0	yellow	yellowish green	light violet
	0.5	light browish violet	brown	brown
	1.0	reddish violet	indigo violet	brown
	5.0	violet	indigo	browish black
	10.0	blue violet	indigo	indigo

III. 60%硫酸による脱脂綿中の人造繊維類定量法

操 作 ：試料約1.1gを風袋既知の秤量瓶に入れ105°Cで2時間乾燥し，その絶対乾燥重量を求める（この重量をWとす）．この乾燥した綿を内容200ccの共栓三角フラスコに移し室温（特に23〜25°C）で60%硫酸100ccを注加し，激しく5分間振盪し7分間放置する．次いで5分間振盪し，8分間放置してから最後に5分間振盪し，直ちにNo. 2のグラスフィルターで吸引沪過する．沪斗上の残留物を60%硫酸100cc，次いで蒸留水で洗滌後1%アンモニア水50cc中に約5分間浸漬して中和し，再び水洗を繰返して中性とした後吸引沪過して水を除き，105°Cで乾燥後その絶対乾燥重量を求める（この重量をW′とする）．次に同様の方法で人造繊維を含まない脱脂綿のみで空試験を行う．

計 算 ：

木綿繊維重量%……$S=\dfrac{W'\times\dfrac{1}{1-\alpha}}{W}\times 100$……(1)

人造繊維重量%……$S'=100-S$．……(2)

α………補正值（0.01〜0.03）

空試験より算出する．

註 補正値（例）

25°C　H_2SO_4　60%…………$\alpha=0.01$

〃　〃　61%…………$\alpha=0.025$

〃　〃　62%…………$\alpha=0.05$

総　括

濃ヨウ素試液による人造繊維類の確認試験は非常に簡便であり，しかも鋭敏な方法である．脱脂綿中に一本の人造繊維類が混入していても肉眼で明瞭に確認し得る．また綿殼や藁，麻等の異物も着色するのでそれ等の検出もなし得る．また未熟の木綿繊維は水洗しても淡い褐紫色を呈し直ちに白色とはならないが，鏡検により綿繊維であることを確認し得た．このものは暫時放置した後再び水洗するとき白色に戻る故，他繊維と容易に識別し得る．

60％硫酸で処理した液にヨウ素試液を滴下する方法は，前法に比して多少面倒ではあるが，混入率を定量的にも検出し得る利点がある．

人造繊維類の重量法による定量を行うに際して60％硫酸の濃度並びに温度，振盪時間等は正確に守る必要がある．木綿繊維は60％硫酸には難溶であるけれども多少は溶解する．硫酸の濃度が60％以下であるときには大して影響はないが，それを超過すると急に綿繊維も溶け易くなる．それ故補正値αの値が急激に増加することが認められた．故に空試験を行う時には特に注意して同一条件を守るべきである．

文　献

1) 祖父江寛：繊維科学．p.15 三省堂（1956）．H. R. Kanersherger : Mathew's Texile Fibers 6 th. ed.（1956）．

2) 尾川，田中：繊工試彙 20.（1938）

Summary

The two methods were studied for the identification, i. e. (1) submersion to the concentrated iodine solution (100g of KI and 20g of I_2 in 100g of water), (2) dissolving in 60%$-H_2SO_4$ and addition of N/10 iodine solution. The determination is performed by 60%$-H_2SO_4$. The item, foreign materials, of the 6 th supplement to the J. P. VI was based on this investigation.

Received June 18, 1957.

衛生材料の研究（第6報）
吸水力試験法の検討

喜谷 市郎右衛門，中島辰巳，吉村 淳
遠藤 勝

Studies on Surgical Dressings. VI.
On the Determining Method of the Absorbency.

Ichirōemon KIDANI, Tatsumi NAKASHIMA,
Kiyoshi YOSHIMURA, and Masaru ENDŌ

まえがき　吸水力試験は脱脂綿の本来の使命を保証するための最も重要な試験項目である．さて J.P.VI はじめ諸外国の薬局方の大部分は水に対する沈降速度のみしか規定していないが，J. P. VIならびに U. S. P. XVは吸水時間（沈降速度）と吸水量（吸水保持量）とを合わせて規定している．

昭和25年以来脱脂綿の国家検査に従事してきた著者等は吸水時間による不適品を時々発見したが，吸水量不足（100g 以下）による不適品は見なかつた．ところで U. S. P. XV は J. P. VI と同じく試料 5 g をとり同じ方法で行つて，しかも吸水保持量は120g以上となつている．この点からみると，J. P. VI 適品は U. S. P. XV適品にの較べて品質が劣るかの感じを与えるし，また一方現在までのところ，この吸水保持量で不適になつたものが無いであるから，当然この試験法には検討を加えて然るべきである．

著者等はJ. P. VIの追補 6 の制定に関連して吸水力試験法の検討を行つたので，ここに報告する．

理論の部

まず J. P. VI の試験かごに試料をつめるときに，試料をつまみとつた場合と鋏等で切りとつた場合とで得られる吸水量に差を生じるが，更にそれ等試料のかごへのつめ方の相違によつても影響をうけるので，まず試料採取場所（検体より試料をとる際の検体中での位置），試料採取法（つまみとるか切りとるか）及び試料の詰め方の三つの因子を種々に組合わせて試験を行つた．

次に吸水保持量即ち水のきりかた（滴下法）であるが，この試験に影響を及ぼす因子としては繊維の水に対する親和性即ち水の繊維に対する表面張力の強さと繊維塊の空隙に水を保持するための繊維自体の固さ及び弾力等があるが，特にこの繊維の固さと弾力をしらべるには水をきるための時間を 10 秒という短時間でなく，より長くすることが必要で，このことは実用上からいつても妥当である．更に本試験に使用する銅網製のかごは一般に市販されておらず，手製で作ろうとしても案外面倒である．又銅網自体非常に沈み易いため．J. P. V の試験（試料を水に投入）では全然沈まない検体でもJ. P. VIの試験法では容易に適品になることもあるので，ガーゼ製の筒につめて行う改良試験法についても検討した．

実験の部

I．検体中の試料採取位置，試料採取法並びに試験かごへのつめ方

実験方法：試料の採取位置，採取法及びつめ方を種々変えて沈降時間及び吸水量を測定した．その結果はTable. 1にみられる通りである．

Table 1.

Sampling Method	Filling Method (to Basket)	Average Time of Submersion (sec.)	Average Weight of Retained Water (g)
Pick up from five parts without cutting	One after the other	1.7	130
	five in roll	1.8	114
Pick up from one part without cutting	just as it is	1.8	118
	divide to five, and one after the other	1.6	128
Cut off from one part with scissors	make roll	1.7	116
Cut off from five parts with scissors	five in each rolls	1.7	111
	five in one roll	2.0	112

考 察 : U. S. P. ならびに J. P. Ⅵ（英語版）には鋏等で切らずにつまみとるように明記されている．非常によく切れる鋏で切断した時はつまみとつた時に較べて比較的差が少いが，切れない鋏を使用した時にはその切断面が圧縮固着されて白い固りの線となり Table 1 の様に吸水量に影響を及ぼす．

五部分の試料を試験かごにつめる時に一つずつ均等につめる方法と，五部分を一まとめにして重ね合わせ丸めて一度につめる方法とではやはり吸水量に差が生じてくる．

Ⅱ．吸水量測定における水の滴下法

a） J. P. Ⅵ 旧法（追補6以前）：「かごを水から静かにとり出し，横にして10秒間水を滴下し直ちにビーカー中で秤量するとき，その吸水量は 100g 以上でなければならない」．

b） J. P. Ⅵ 新法（追補6以後）：「かごを水から静かにとり出し，10 メッシュの金網上に置いて 1 分間水を滴下し，直ちにビーカー中で秤量するとき，その吸水量は100g以上でなければならない」．

上記の方法で滴下時間を検討したところ，Table. 2. の結果を得た．即ち旧法にしたがつて脱脂綿を試験したところ水から試験かごをとり出し 10秒経過すると過剰の水はそれまでに全部滴下が終つているために，以後吸水量は変らないのに，スフでは 10秒後もなお水が滴下し 1 分後に漸く恒量に達した．そこで新法にしたがつて実験を行つたところ，1 分間金網（10メッシュ）上に放置することにより保持する手数をかけずに容易に恒量に達した．

最近の国産の脱脂綿 16社の製品についてこの両者の比較試験を行つたところ Table 3．の結果を得た．旧法の平均吸水量は128g，新法のは118gで両者の差は平均10gであつた．

次に著者等の入手し得たスフ・アセテートについて検討した結果 Table 4 を得た．現今の人造繊維類は水の保持力が無いため，たとえ旧法で 100g以上の吸水量を持つものでも新法ではずつと低い数値を示す．

Table 2.

	Time of Dropping sec.	Retention g	
		Goss. Abs.,	Viscose Ray.
J. P. Ⅵ.	10	128	107
	60	128	92
	120	128	92
Supplement. 6.	60	118	92
	120	118	92
	180	118	92

Table 3. Difference of Absorbency between J. P. Ⅵ and Supplement 6. (Goss. Abs.)

Maker	Lot. No.	Samp. No. 1956	Time of Submersion sec.	Absorbency J. P. Ⅵ. g	Absorbency Supplement 6. g	difference
A	42-3	2200	1.8	122	114	8
B	296	2140	1.7	131	122	9
C	919	2191	3.2	128	118	10
D	582	1992	1.9	131	124	7
E	706	2185	2.7	136	128	8
F	22	2113	2.1	138	125	13
G	134-1	2141	2.7	132	121	11
H	75	2190	2.6	129	124	5
I	1-10	2125	1.9	121	105	16
J	0228	2136	1.4	126	112	14
K	17	2167	2.2	124	119	5
L	155	2127	1.6	127	120	7
M	5	2122	2.3	121	115	6
N	34	2119	1.6	129	111	18
O	116	2118	3.1	129	114	15
P	81	1977	3.5	124	116	8
$\bar{x}$			2.26	128	118	10

Table 4. Difference of Absorbency between J. P. Ⅵ and Supplement 6. (Artifical Fibers)

	Time of Submersion sec.	Absorbency J. P. Ⅵ. g	Absorbency Supplement 6. g	difference
Viscos Rayon A′	32.0	107	92	15
〃 〃 B′	2.6	96	82	14
〃 〃 C′	2.5	72	59	13
Acetate Rayon	not submerge (submerged by glass rod)	73	58	15

Ⅲ. 試 験 か ご

a) J. P. Ⅵ. 試験かご「径約0.4mmの銅線（20番線）を用いて作つた径約5cm，深さ約8cm，線と線との距離約2cmで重さ約3g以下の試験かご」.

b) 自製ガーゼ製試験かご：「局方ガーゼ（17cm×8cm）を縫い合わせて上記試験かごと同じ大きさの試験筒を作る．その際筒の両側を糸でかがり，ガーゼがほつれない様に縁をつけたものと，そのままで縁をつけないものとを作製した．

J. P. Ⅵ. 試験かごと自製ガーゼ筒との試験結果は Table 5 のようになる．

Table 5. Comparison of Test Basket

	J.P.Ⅵ. Test Basket		Gauze Basket with folded Rim		Gauze Basket without Rim	
	Time of Submersion sec.	Retention g	Time of Submersion sec.	Retention g	Time of Submersion sec.	Retention g
Goss. Abs. A′	3.5	124	4.8	117	4.2	114
〃 B′	4.2	125	4.8	106	5.2	112
Goss. Abs. C′ (unsuitable)	16.5	115	21.0	102	17.2	109
Goss. Abs. D′ (unripe cotton)	5.9	118	6.4	120	—	—
Viscose Rayon	4.3	112	6.5	96	6.0	97
Other Artificial Fiber	25.8	103	47.6	84	29.0	95

総　括

1) 試験かごに試料をつめる方法は試料を5箇所の異つた部分からつまみとるべきで鋏等で切りとつてはならない．

2) 試料は特に圧したりまた重ねたりすることなく，一つずつ均等につめる様に試験かごに入れなくてはならない．

3) 水の滴下時間は木綿を原料とする脱脂綿であれば10秒以内であるが，人造繊維類は10秒では不足で1分と定めるべきである．

4) J.P.Ⅵ.の試験かごの自重による影響を排除すればどうなるか，また手製で簡単に作り得る代用品は無いかという点を考えて，自製ガーゼ筒を用い，ある程度代用し得ることを認めた．

Summary

The retainig ability of absorbent cotton to water in the item "absorbency" of J. P. Ⅵ is 100g and the same of U. S. P. ⅩⅤ is 120g, but these methods are completely equal. We studied this subject, and conclude that the method prescribed on the 6th supplement to the J. P. Ⅵ is most rational in our country. This method was based on this investigation.

Received June 18, 1957.

衛生材料の研究（第7報）
木綿と人造繊維類の比較

喜谷市郎右衛門, 中島辰巳, 吉村　淳
遠藤　勝, 五十川泰郎

Studies on Surgical Dressings. VII.
Difference between the Absorbent Cotton and the Artificial Fibers.

Ichirōemon KIDANI, Tatsumi NAKASHIMA, Kiyoshi YOSHIMURA,
Masaru ENDŌ, and Yasuo ISOGAWA

まえがき　衛生材料の素材としての人造繊維に検討を加えるために本研究を行つた．即ち各種人造繊維が示す水及び有機溶媒に対する吸収力（沈降速度）や保持力，及びこれ等繊維を綿栓又は綿棒等に使用する際の適否を判定するために，各種薬液に対する影響等を木綿を原料とする脱脂綿と比較して調査した．但しこの薬液に対する作用は厳密にいえば薬液中の溶質に対する作用と，溶媒に対する作用との二つに分けて考えるべきであろうが，今回は実験を簡略化するためと実用的見地とからこの二つの因子を分けずに薬液としての濃度の変化を調べた．

なお以前に著者等が実験した結果によれば，日常の湿度の変動に対する脱脂綿の重量の変動は±3％以内であり，又湿度の変動が吸水力に及ぼす影響は局方適品ならば殆んど影響しないことが分つているので本実験においてはその影響は殆んど無視して差支えない故考慮しなかつた．

人造繊維は可紡性を増すためにオイリングし，又防水性を与えるために樹脂加工をすることが多いが，もとよりこの様な加工品は衛生材料としては不適当なので，この様な処理をしないものを選んだため，著者等の入手し得たものは極めて限られたものとなつた．しかも尚且オイリング加工済みらしいものが一検体あつた．

第I部　水及び有機溶媒に対する吸収力と保持力

勿論この場合の吸収力とは繊維そのものに対する液体の吸収よりも繊維塊の空間に吸収することの方が重要な意味を持つている．

実験の部

J. P. VI. の吸水力試験法により各種繊維類の水及び有機溶媒に対する沈降時間及び保持量をしらべた．結果はTable. 1. に示す．保持量の数値はそれぞれ二種示されているが，上段は追補6以前の操作法により，下段は追補6（昭和31. 12. 25公布）によつた．

なお沈降時間（沈降速度）はFig. 1. に，保持量はFig. 2. に図示した．

Table 1. Submersion Time and Solvent Retention of Goss. Abs. and Artificial Fibers for various Solvents.

Kind of Fibers	Name of Goods.	Sample No.	Water. T. (sec)*	Water. R. (g)△	ab. Alcohol T. (sec)	ab. Alcohol R. (g)	Benzene T. (sec)	Benzene R. (g)	Petrol Benzine T. (sec)	Petrol Benzine R. (g)	Average, $\bar{x}$ R. (g)	Average, $\bar{x}$ R. (g)
Goss. Abs.	A	I	(2.2)	137 127	(2.2)	104	(1.3)	107	(1.0)	85	112	113
	B	II	(7.3)	138 133	(2.1)	107	(1.4)	110	(1.1)	80	114	
Viscose Rayon	Kane. Bō (鐘紡) 20×2	III	(2.0)	70 73	(1.4)	48	(1.6)	65	(0.8)	46	60	75.3
	Fuji. Bō. (富士紡) 2D×2	IV	(2.7)	95 86	(1.7)	66	(1.6)	57	(0.8)	55	72	
	Tei. Jin. (帝人) 2D×2	V	(7.8) (12.7)	89 77	(1.5)	64	(2.3)	80	(0.8)	55	73	
	Tōyō. Bō. (東洋紡) SF. ヨロイ	VI	(3.0)	107 88	(2.4)	103	(2.0)	118	(1.2)	96	102	
	Daiwa. Bō. (大和紡)	VII	(2.8)	86 67	(1.2)	57	(1.0)	59	(0.8)	48	63	
	Nittō. Bō. 日東紡 SF. 1.5D.	VIII	(2.6)	90 84	(2.0)	77	(1.2)	92	(1.0)	68	82	
Acetate Rayon	Ni. Chitsu. 日 窒 3 D×2	IX	(2.2)	70 72	(1.6)	49	(1.7)	51	(0.8)	41	57	60.0
	Ni. Seru. 日セル 3 D×2	X	(2.0)	84 80	(1.7)	56	(1.6)	70	(0.8)	46	67	
	Tōhō. Ray. 東邦レ 5 D	XI	(2.2)	70 68	(1.0)	45	(0.8)	51	(0.8)	40	55	
Nylon	Nichi. Ray. 日 レ 2 D×2	XII	(3.2)	59 55	(1.4)	55	(1.0)	43	(1.0)	44	51	60.0
	Du. Pont. 3 D×2	XIII	(180.0)	87 70	(2.5)	66	(1.6)	62	(1.0)	60	69	
Vinylon	Kura. Ray. 倉 レ 1.4D×$1^{3}/_{8}$	XIV	(6.8)	82 69	(1.8)	59	(1.4)	65	(1.0)	40	63	60.0
	Nichi. Bō. 日 紡 1.4D×1	XV	(21.0)	70 65	(1.4)	42	(2.0)	62	(1.0)	43	56	

* T.………Time of Submersion.

△ R.………Retention.

Fig. 1.

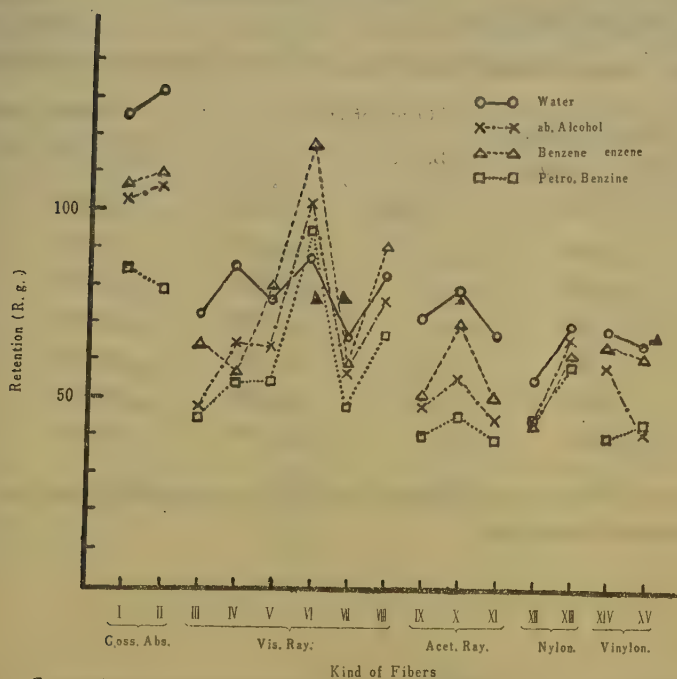
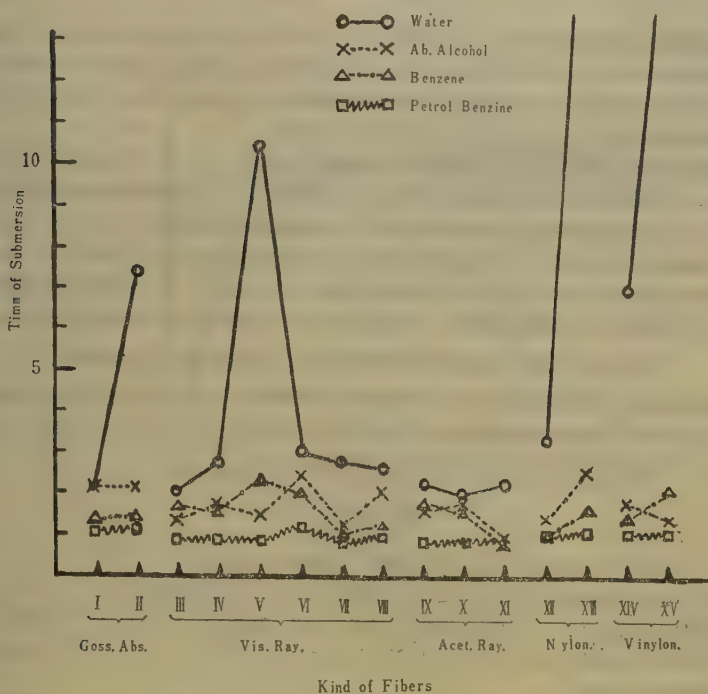



Fig. 2. Comparison of various Solvent Reteintions of Goss. Abs. and Artificial Fibers

考　察

沈降時間は繊維塊が水又は溶媒を吸収する早さに比例すると考えられるが，現在大阪支所へ国家検査に提出される脱脂綿の大部分においては，Table 1に見られるように2.2秒前後である．検体Ⅱは7.3秒という限度近い数値を示し，要注意の不良製品であるが各種溶媒の吸収力試験を行う為に特に参考に供したものである．検体Ⅴの沈降速度が非常に遅いのはオイリング加工をしてあるためと思う．

保持量は繊維塊が水又は溶媒を吸収して保持する力の大小を示すものでJ. P. Ⅵでは綿5gにつき1分後に100g以上，U. S. P. ⅩⅤでは綿5gにつき10秒後に120g以上と規定している．脱脂綿の試験結果ではどの製品も規格に合格しているが，他の人造繊維はいずれも規格以下で，脱脂綿の保持量の2/3以下である．これは化学的に考察すれば吸水力は繊維の分子についている親水基や疎水基により影響される処が大であろうが，又物理的な面を考察すると綿繊維のようにねじれたリボン状でその両側の縁がふくれており，且つ弾性の大きな繊維は構造上非常に有効であるように思われる．有機溶媒に対しても脱脂綿がすぐれた保持力を示すのはこのためと考える．

第Ⅱ部　各種医薬品溶液の脱脂綿並びに人造繊維浸漬による濃度変化

本実験は検体を薬液に一定時間浸漬したときの薬液成分の濃度変化をしらべるのであるから厳密にいえば「まえがき」中でもふれたように薬液中の溶媒及び溶質に対する作用に分けて考えるべきであるが，実用上は薬液の濃度変化をしらべても充分意味があると考えたので本実験を行つた．

実 験 の 部

(1)　マーキュロクロム液（J. N. F. Ⅱ）の脱脂綿による経時的濃度変化

脱脂綿2.5gずつを内容100ccの共栓三角フラスコ6箇に入れ，更に国民医薬集マーキュロクロム液（Hg含量：0.4375%）各50ccを正確に入れ，それぞれ浸漬させ5分，10分，15分，30分，1時間，2時間，3時間振盪させた後，ガラス棒で圧して浸出した液について，J. N. F. Ⅱにしたがつてマーキュロクロム液中の水銀含量を定量し，なお別に空試験を行つた．

結果はTable 2，Fig. 3．に示す通りである．

Table 2.　Effect of Stirring Time of Goss. Abs. in Liq. Mercurochr. (J. N. F. Ⅱ)

Sample No.	Time of Stirring (mins)	Conc. of Hg (%)		Variation rate (%)	
		B. T.	A. T.	C＝A. T/B. T×100	C－100
Ⅰ	5	0.4375	0.4229	96.66	−3.34
Ⅱ	10	〃	0.4307	98.47	−1.53
Ⅲ	15	〃	0.4344	99.29	−0.71
Ⅳ	30	〃	0.4385	100.22	+0.22
Ⅴ	60	〃	0.4396	100.48	+0.48
Ⅵ	120	〃	0.4396	100.48	+0.48
Ⅶ	180	〃	0.4396	100.48	+0.48

B. T. and A. T. show the concentrations (Hg%) of Liq. Mercurochr. before and after treatment respectively.

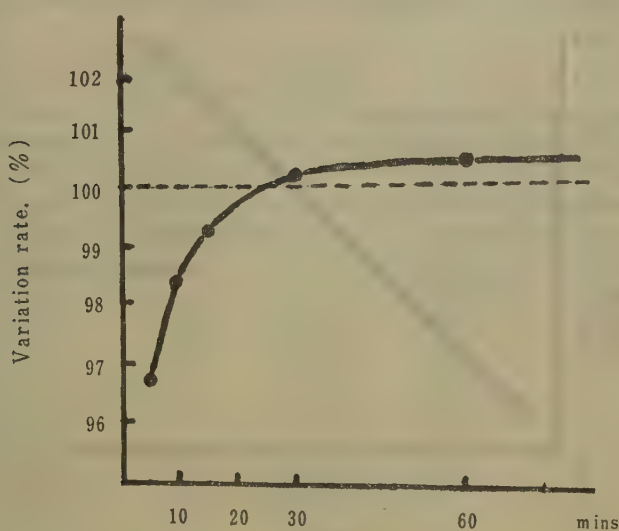



Fig. 3.

この結果より見ると水銀含量は初め急に低くなり（96.7%），後は時間の経過と共に元に復し最後には原液より高濃度（100.5%）で恒量に達しそれ以後は変化しない．これを一応の限度として以後の実験では浸漬させ振盪する時間を1時間とした．

(2) 各種濃度のマーキュロクロム液の脱脂綿による濃度変化

7種類の異つた濃度のマーキュロクロム液を作つて，(1)に準じて実験を行つた．その結果は Table 3 及び Fig. 4 に示す通りである．

Table 3. Effect by Varying the Concentration of Liq. Mercurochr. (J. N. F. Ⅱ) by Goss. Abs.

	Conc. of Hg (%)		Difference	Variation rate %	
	B. T. Before Preat.	A. T. After Treat.	B. T. −A. T.	C＝A. T/B. T×100	C−100
Ⅰ	0.1199	0.1439	+0.0240	120.02	+20.02
Ⅱ	0.2206	0.2321	+0.0115	105.21	+5.21
Ⅲ	0.3129	0.3139	+0.0010	100.32	+0.32
Ⅳ	0.5439	0.5439	±0	0	0
Ⅴ	0.6863	0.6821	−0.0042	99.39	−0.61
Ⅵ	0.7823	0.7760	−0.0063	99.19	−0.81
Ⅶ	1.0013	0.9820	−0.0193	98.07	−1.93

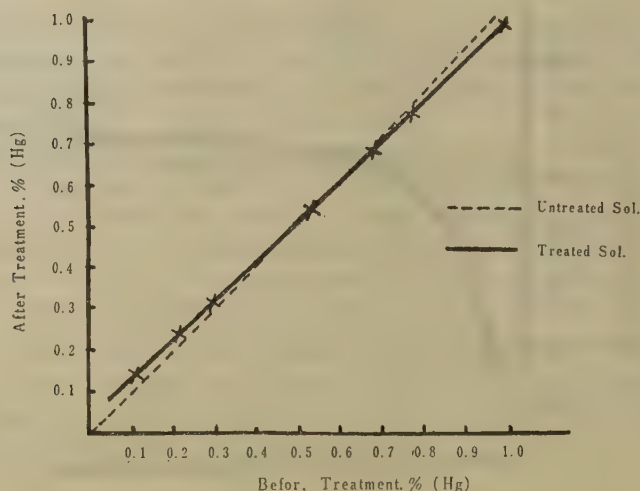



Fig. 4.

以上の結果より稀薄なマーキュロクロム液に脱脂綿を浸漬した場合は，処理後の浸液中の水銀含量が増大し，濃厚な原液に浸したときには，その浸液中の水銀濃度は低下する．原液濃度が J. N. F. Ⅱ規定濃度附近のものの濃度変化は余り見られなかつた．

(3) マーキュロクロム液（J. N. F. Ⅱ）の脱脂綿及び人造繊維による濃度変化について

前出の脱脂綿及び人造繊維類 15種の各 2.5g を前法に準じて水銀含量の増減をしらべた．結果は Table 4 及び Fig. 5 に見られるように脱脂綿，アセテートでは水銀含量がやや増大したに過ぎなかつたが，ビスコーススフ並びにナイロン特にビニロンでは水銀含量が非常に減少した．以上により脱脂綿よりも人造繊維の方がマーキュロクロムを吸着するようである．

Table 4. Absorption of Mercurochrome by Various Fibers.

Kind of Fibers	Sample No.	Conc. of Hg %		Variation rate %		Average	Dyeing Intensity
		B. T.	A. T.	A. T/B. T ×100 (c)	C−100	x̄	
Goss. Abs.	Ⅰ Ⅱ	0.4987 〃	0.504 0.501	100.92 100.40	+0.92 +0.40	+0.66	③
Viscose Rayon	Ⅲ Ⅳ Ⅴ Ⅵ Ⅶ Ⅷ	〃 〃 〃 0.452 〃 〃	0.463 0.542 0.491 0.437 0.415 0.411	92.78 108.72 98.44 96.68 91.81 90.93	−7.22 +8.70 −1.56 −3.32 −8.19 −9.07	−3.44	①
Acetate Rayon	Ⅸ Ⅹ Ⅺ	0.4987 〃 0.452	0.505 0.531 0.414	101.26 106.48 91.59	+1.26 +6.48 −8.41	+1.33	⑤
Nylon	Ⅻ XⅢ	0.4987 〃	0.5009 0.4666	100.40 93.56	+0.40 −6.44	−3.02	④
Vinylon	XⅣ XⅤ	〃 〃	0.4471 0.4498	89.65 90.19	−10.35 − 9.81	−10.08	②

なお，本実験の後各試料を同一条件で水洗乾燥した後その染色度を見ると，その濃さは次のような順になつている．

ビスコース・スフ＞ビニロン＞脱脂綿＞ナイロン＞アセテート

(4)　稀ヨードチンキ中有効ヨウ素の各種繊維による濃度変化

(2)に準じてJ. P. Ⅵの稀ヨードチンキにつきJ. P. Ⅵ の定量法で試験を行つた結果は，Table 5，Fig. 5に示す通り脱脂綿では原液濃度が僅か減少する程度に過ぎないのに人造繊維類では，ビスコーススフ，ビニロン，ナイロン，アセテートの順に多量の有効ヨウ素が消費される．

Table 5. Absorption of Iodine by Various Fibers in Tr. Iod. Dil.

Kind of Fibers	Sample No.	Conc. of Iodine %		Variation rate %		Average $\bar{x}$
		B. T.	A. T.	A. T/B. T ×100＝C	C－100	
Goss. Abs.	Ⅰ	2.93	2.91	99.32	－0.68	－0.59
	Ⅱ	3.09	3.07	90.50	－0.50	
Viscose Rayon	Ⅲ	2.93	2.86	97.61	－2.39	－1.25
	Ⅳ	〃	2.90	98.98	－1.02	
	Ⅴ	〃	2.93	100.00	±0	
	Ⅵ	〃	2.92	99.96	－0.04	
	Ⅶ	〃	2.85	97.27	－2.73	
	Ⅷ	〃	2.86	97.61	－2.39	
Acetate Rayon	Ⅸ	〃	2.46	84.98	－13.02	－13.25
	Ⅹ	〃	2.48	84.64	－13.36	
	Ⅺ	〃	2.48	84.64	－13.36	
Nylon	Ⅻ	〃	2.64	91.47	－8.53	－9.21
	XⅢ	〃	2.64	90.10	－9.93	
Vinylon	XⅣ	〃	2.75	93.86	－6.14	－5.21
	XⅤ	〃	2.81	95.90	－4.10	

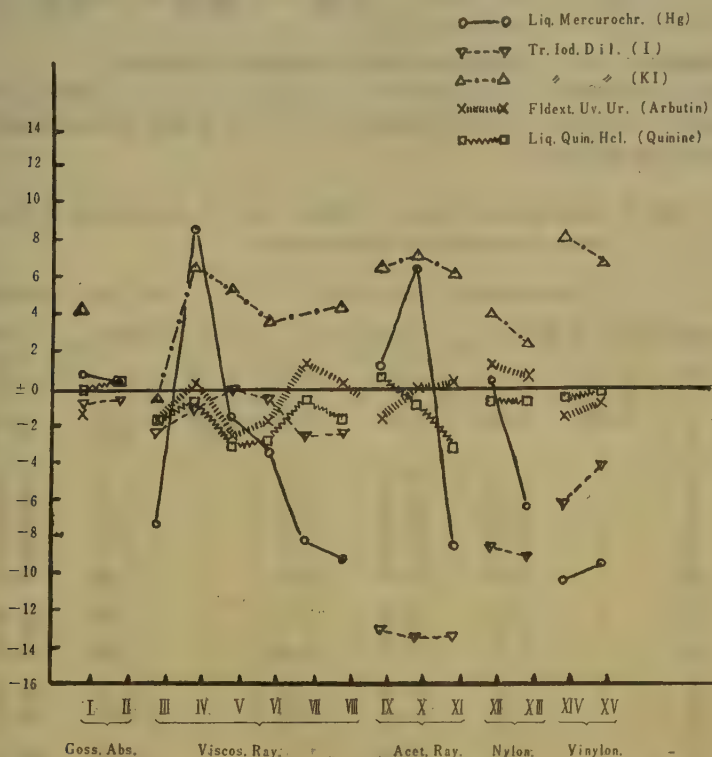



Fig. 5.

(5) 稀ヨードチンキ中ヨウ化カリウムの各種繊維による濃度変化

前項に準じ J. P. Ⅵ のヨウ化カリウム定量法で試験を行つた結果は Table, 6. Fig. 5. に示す通り各繊維何れも原液に比して処理液の濃度が増大している．

Table 6. Absorption of KI in Tr. Iod. Dil. by Various Fibers.

Kind of Fibers	Sample No.	Conc. of KI % B. T.	Conc. of KI % A. T.	Variation rate % A.T/B.T ×100=C	Variation rate % C−100	Average $\bar{x}$
Goss. Abs.	Ⅰ	2.002	2.094	104.59	+4.59	+4.59
	Ⅱ	—	—	—	—	
Viscose Rayon	Ⅲ	2.002	1.996	99.70	−0.30	+2.06
	Ⅳ	〃	2.135	106.84	+6.84	
	Ⅴ	〃	2.116	105.69	+5.69	
	Ⅵ	〃	2.079	103.84	+3.84	
	Ⅶ	〃	1.992	99.53	−0.47	
	Ⅷ	〃	2.098	104.79	+4.79	
Acetate Rayon	Ⅸ	〃	2.138	106.79	+6.79	+6.79
	Ⅹ	〃	2.151	107.44	+7.44	
	Ⅺ	〃	2.125	106.14	+6.14	
Nylon	Ⅻ	〃	2.083	104.05	+4.05	+3.35
	XⅢ	〃	2.055	102.65	+2.65	
Vinylon	XⅣ	〃	2.169	108.34	+8.34	+7.64
	XⅤ	〃	2.141	106.94	+6.94	

(6) 配糖体製剤並びにアルカロイド製剤溶液の有効成分の各種繊維による濃度変化

配糖体製剤としては3.109%のアルブチン含有のウワウルシ流エキス，アルカロイド製剤として3.465%のキニーネ含有の塩酸キニーネ水溶液について前項の方法にしたがつて J. P. Ⅵ 法で，有効成分の定量を行つた．その結果はTable 7 及びFig. 5 に示した．

Table 7. Absorptions of Arbutin in Fldext. Uv. Ur. and Quinine in Liq. Quin. Hydrochlor. by Various Fibers.

Kind of Fibers	Sample No.	Fluidextractum UVAE URSI: Conc. of Arbutin % B. T.	A. T.	Variation rate % A.T/B.T ×100=C	C−100	Liq. Quin. Hydrochlor.: Conc. of Quine % B. T.	A. T.	Variation rate % A.T/B.T ×100=C	C−100
Goss. Abs.	Ⅰ	3.109	3.078	99.03	−0.97	3.465	3.465	100.00	±0
	Ⅱ	—	—	—	—	〃	3.482	100.49	+0.49
Viscose Rayon	Ⅲ	〃	3.049	98.07	−1.93	〃	3.400	98.12	−1.88
	Ⅳ	〃	3.120	100.38	+0.38	〃	3.411	99.31	−0.69
	Ⅴ	〃	3.031	97.49	−2.51	〃	3.359	96.94	−3.06
	Ⅵ	〃	3.049	98.07	−1.93	〃	3.359	96.94	−3.06
	Ⅶ	〃	3.051	101.35	+1.35	〃	3.441	99.31	−0.69
	Ⅷ	〃	3.120	100.38	+0.38	〃	3.400	98.12	−1.88
Acetate Rayon	Ⅸ	〃	3.061	98.46	−1.54	〃	3.482	100.49	+0.49
	Ⅹ	〃	3.109	100.00	±0	〃	3.441	99.31	−0.69
	Ⅺ	〃	3.121	100.39	+0.39	〃	3.359	96.94	−3.06
Nylon	Ⅻ	〃	3.151	101.35	+1.35	〃	3.441	99.31	−0.69
	XⅢ	〃	3.138	100.96	+0.96	〃	3.441	99.31	−0.69
Vinylon	XⅣ	〃	3.060	98.45	−1.55	〃	3.441	99.31	−0.69
	XⅤ	〃	3.090	99.42	−0.58	〃	3.482	100.49	+0.49

定量法が煩雑なため相当の実験誤差を伴うものと考えられるので有意差を認めるためには更に実験を重ねるべきものと考えられるが，配糖体並びにアルカロイド製剤は繊維類によつて余り影響を受けないと考えてよい．

最後に Fig. 5 に各種薬液の繊維による濃度変化を図示した．

総　　括

以上現在著者等が入手し得た検体について実験を行つたところでは脱脂綿の代用に人造繊維を使用することは余り望ましくないという結果を得た．しかし，本結果は人造繊維類を脱脂綿に代用しまたは混用することの可否を結論するものとはいえない．むしろ結論に至るための一，二の研究課題を提起したに過ぎず多方面に亘り今後も研究が行われることこそ望ましいと思う．

本研究を行うに当り，諸種の試料を提供された西部衛生材料協同組合並びに同組合技術研究会に厚く感謝する．

Summary

We studied the absorbency and retaining ability to water and organic solvents and chemical absorbability to medicinal substances which exist in the solution about the absorbent cotton and artificial fibers, and we obtained the result that the artificial fibers received now are not suitable to use as surgical dressings, especially to take the place of the absorbent cotton, but it is necessary to investigate the subject from many sites in order to reach the conclusion.

Received June 18, 1957.

衛生材料の研究（第8報）

印棉を原料とする国産脱脂綿の性状について

喜谷市郎右衛門，中島辰巳，吉村　淳，
遠藤　勝

Studies on Surgical Dressings. VIII.
On the Properties of the Japanese Absorbent Cotton made from Indian and Pakistan Cotton.

Ichirōemon KIDANI, Tatsumi NAKASHIMA, Kiyoshi YOSHIMURA,
and Masaru ENDō

まえがき　J. P. Vでは脱脂綿の性状に関し第二項において，「本品は純白にして種子の他の部分を混有すべからず」と定め，又J. P. VI（追補6）は性状の項において「本品は白いほとんど無臭無味の繊維状の軟毛で，著しい綿塊を含まず，鏡検すると偏平で筋のあるねじれた中空のリボン状で縁はわずかに厚い．本品はアンモニア銅試液に溶けるが普通の溶剤には溶けない．」と定め，いずれも判然とした数値の出る物理的試験とはいえない．又J. P. VIの試験にはU. S. P. XVに類似した試験が多いが，U. S. P.にあつてJ. P. VIにない項目としては無菌試験の他に，物理的な繊維長，化学的な脂肪含量の試験がある．この繊維長の規定には「$^1/_2$吋以上のものが60%以上，$^1/_4$吋以下のものが10%以下」とあるが，米棉に比して印度棉の繊維長が短いことは明らかであるから，原料として殆んど印度棉を使用している日本製脱脂綿の繊維長試験にU. S. P. XV. の規定をそのまま適用することは妥当ではない．

又わが国では脱脂綿を生理用として使用する際の適否判定基準の一つとして，いわゆる“腰の強さ”ということがいわれるが，この表現の内容も種々の物理的試験によつて数値で表わし得るかも知れない．

以上のような見地より諸種の物理的試験を行つてみる必要を感じていたので，今回有志の協力により原棉（但し打綿，繰綿，梳綿等の物理的な工程を終つたもの）及びそれより製造した脱脂綿を用いて諸種の試験を行う機会を得たのでその結果を報告する．なお得られた数値は全部まとめて局方試験及び他の化学試験の結果と共にTable 1, 2, 3に記載してある．

実験方法

今回 1) 繊維長，2) 強力，3) 繊度，4) 異物及び 5) 色相の5項目について検討した．

1)　繊維長：この試験は文字通り繊維の長さをしらべるわけで，まえがきで述べたとおりU. S. P.法では$^1/_2$吋以上のもの及び$^1/_4$吋以下のものの含有率をしらべることになつているが，著者等は更に平均繊維長と紡績業界で慣用されている有効繊維長及び短繊維含有率をもしらべた．

この試験はU. S. P. XVに記載されているDuplex Cotton Fiber Sorter（又はDouble Sorter）を用いて行う．本器及び附属品の形状はU. S. P. XV[1]に記載されているが，正面図はFig. aである．かくの如く左右に鉄製の櫛状の板(Comb)を3.2mmの間隔で少くとも12個持つており，この櫛状の板は順次下方へ落せるようになつている．

a.　　　　b.

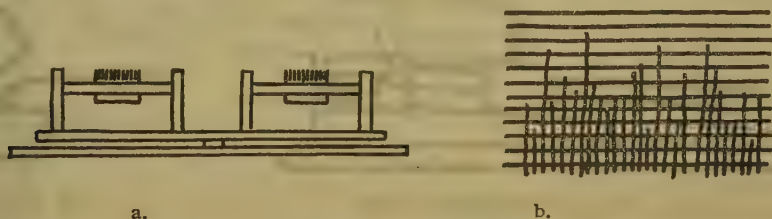



Fig. 1. Duplex Cotton Fiber Sorter

櫛の一組をSorter（分別器又は分類器）とよび，左右2組あるのでDuplex Cotton Fiber Sorterという．中央に軸を持ち自由に廻転出来る．Sorterの一つの平面図がb.で，綿繊維を櫛けずつて保持している状態が画いてある．即ち本器で試験をするには一定重量（75mg）の繊維をまず小量ずつ一つのSorterで櫛けずり，それから他のSorterに長い繊維から逐次平行に引き揃えながら移しかえる．これを数回繰返す．この図でわかるように，繊維は手前を揃えると向う側は繊維の長短による出入りがある．そこでSorterを180°回転して長短の出入りのある方を手前にし，櫛を手前から順に落して出てくる繊維を先端の巾の広いピンセットで長いものから順次にとり出し，ビロードの黒布上に左から順に底辺を揃えて一定の巾（16cm．$6^1/_4$吋）の中に均等に配列し，その輪劃を特殊のうすいグラフ用紙に写しとり，プラニメーターで面積を測定する．その面積を底辺で割れば平均繊維長が出る．繊維をならべた図はFig. 2のように上辺に曲線があるが，$^1/_2$吋以上のもの及び$^1/_4$吋以下のものの重量%は繊維が一様な密度で存在するものとしてその面積より計算した．但しU. S. P.では$^1/_2$吋以上，$^1/_4$吋以下，及びその中間の3部分をそれぞれ一まとめにしその目方をはかり最初の試料の目方（75mg）で割つてそれぞれの含有率を算出する．

次に有効繊維長及び短繊維含有率の算出法はFig. 2の矢印方向で示される．

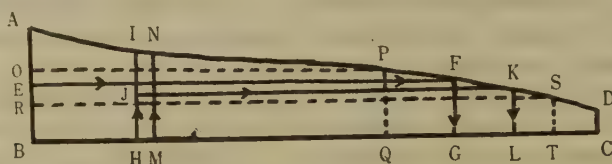



Fig. 2.

① AE=BE	⑨ BM=$^1/_4$BL		
② EF∥BC	⑩ MN⊥BC		
③ FG⊥BC	⑪ BO=$^1/_2$in.	Mean length	☐ABCD/BC
④ BH=$^1/_4$BG	⑫ OP∥BC	Longer than $^1/_2$in(%)	☐ABQP/☐ABCD×100
⑤ HI⊥BC	⑬ PQ⊥BC	Shorter than $^1/_4$in(%)	☐CDST/☐ABCD×100
⑥ HJ=IJ	⑭ BR=$^1/_4$in.	Significant Fiber length(in)	MN
⑦ JK∥BC	⑮ RS∥BC	Contains of short Fiber(%)	☐CDFG/☐ABCD×100
⑧ KL⊥BC	⑯ ST⊥BC		

2) 強力：この試験はPressley Fiber Strength Tester（プレッスレー試験器）で行う．この器械で測定するのは引張り強さ（抗張力）と同じであるが，従来繊維業界では強力（lbs/平方吋）という表現が慣用されているのでここでもそれにしたがつた．この器械の要点はFig. 3のようで右端で上下一対のClampに一定量の繊維束を固定しその左に支点があつて腕が左方へ伸びており，そこを可動重錘が傾斜により左方へ滑つてゆくと，繊維の強さに応じたある位置まで来ると挺子の原理によつて繊維にかかる引張力がその限度を超えて繊維は切れ左腕が下へ落ちる．重錘と下の斜面の間は僅かな隙間しかなく，落下と同時に重錘の左方への移動は自動的に停止する．その時の目盛（lbs）をSとし試料の重さ（mg）をWとすれば，S/Wによつてこの器械による測定値Pressley Indexの値が求められる．Fig. 4にはClampが拡大して画いてある．

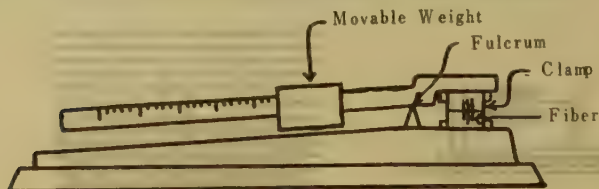



Fig. 3. Pressley Fiber-Strength Tester

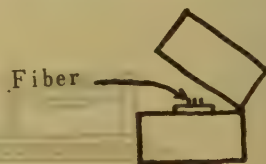



Fig. 4.

Pressley Index を強力（1000lbs/吋^2）に換算するには次式による．

1000lbs/in^2 単位＝（10.8116×Pressley Index）−0.1200

実際の試験に際しては，よく櫛けずつて約1/8吋巾に揃えた繊維一定量（約1cmの長さに切断した場合の重量が約2mgとなる）をとり，注意して出来るだけ条件が一定するようにして Fig.4. にあるClampにとりつけ，器外に出た繊維の余分の部分は切り捨て一定の長さ(1cm)にしておく．この Clamp の繊維を挟む部分は一方が金属，他方は皮革が貼付してあつてその間に挟み，固定するようになつているが，木綿繊維のそれ自体のねじれ，固定する際の（微視的）条件が一定しにくいことなどのために熟練してもなおかつ条件が一定し難い．試験が済んで真中で切断された繊維を Clamp からとり出し，1/50mg 精度のトーションバランスで重量を測り，その重量と Testerの目盛りとから前記したように Pressley Index 及び強力等を算出する．

3）織度 Finess：繊維の太さの試験であるが，本試験は Micronaire 法で行つた．

この試験器即ちMicronaire Tester の原理は，一定量の試料を一定容積に圧した時繊維が太ければFig. 5aのようになり，繊維が細ければbのようになる．aの繊維間の間隙はbのそれよりも大きい．本器の構造の要点はFig.6に示してあるが，試料を入れる場所は左方の円筒である．そこで一定量（3.24g）の試料をこの円筒（径1吋深さ

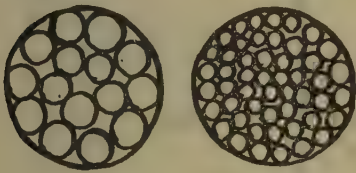
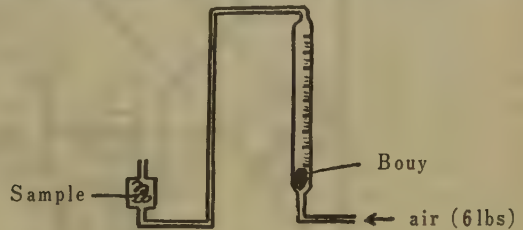



Fig. 5.　　Fig. 6.

1吋）の中に出来るだけ均等に詰め，右方から一定圧力（6lbs）の空気を送り込むと，この繊維の間隙をくぐり抜ける空気量は Fig. 5 のaの場合の方が多い．このようにして通過してくる空気量を目盛ガラス管内の浮標によつて直読みして繊維の太さ（ug/in）を測定する．即ち検体繊維を1本とり，もしその長さを1吋とすればその1本の繊維の重量がこの目盛に示された重量であることを示している．したがつてこれを重量繊度と称する．本試験を行うには勿論検体を一様に詰めることが必要であるが，その他に繊維の表面の形状，断面の形状，ねじれの程度，また繊維の密度等が異なれば当然条件が変るから数値の精度も悪い．本器は元来米国のアップランド綿にのみ用いるべきであるが，然し著者等の実施した試験においても検体の相違による数値の差は充分意味があると考えられる．

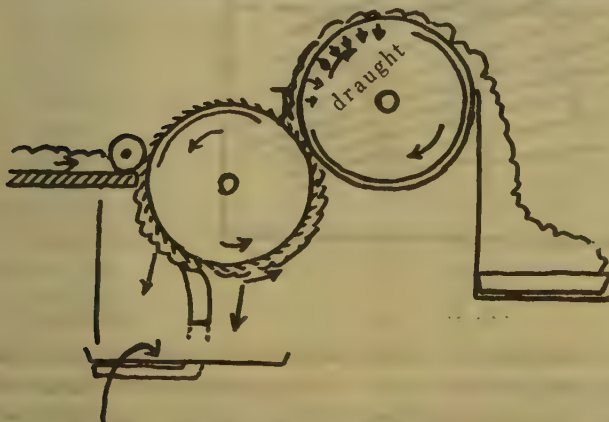



Fig. 7. Other Foreign matter

4）不純物：Fig. 7 に要点を示したShirley Analyser で試験する．まず左方から入つて来る試料を Scutcher でかきとる．次の円筒には小孔が多数あいていて試料を置く台の下から器械の中へ空気が吸込まれるようになつている．したがつて比重の重い異物は仕切りの手前で下方へ落ち，繊維は右方の円筒に附着して回転し，円筒の右側に溜る．仕切りと Scutcher の間の間隔は5/1000吋であるが，この間隔が変ると結果も当然変るので重要な意味を持つ．処理後に下方へ落下したものが不純物で右端へ出たものが lint（繊維）であるが，異物と繊維の和と原重量との差は気流に吸込まれてドラフトに出た分量であるがこの量をも夾雑物として算出する．

本試験を実施するにはまず100gの試料をこのShirley Analyserにかけてlintと不純物とに分け，それ等を再び別々に本器にかけてそれぞれlintと不純物に分け，lint同志及び不純物同志の重量和を求める．

5）色相：本試験に使用したCotton Colorimeterは繊度を測定した際のMicronaire法と同じく本来米国のアップランド綿に対してのみ用いるべきであるが，著者等の場合にもMicronaire法と同じく充分参考に供し得る．

本器は明度（Darkness明暗度・白さ）と，彩度（Color色相・この場合は黄色の濃さ）を自動的に測定するようになつている．即ちその原理はFig.8のように器内の2個のSpot lightが45°の角度で試料を下から照射し，この光を2組のPhoto cellがとらえる．Photo cellの1組RdはDark ness（明度），を他の1組BはColor（色相）をとらえ，それぞれ指針に連絡する．

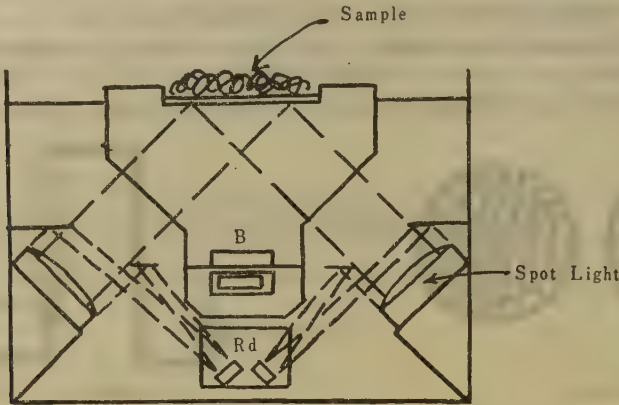



Fig. 8.

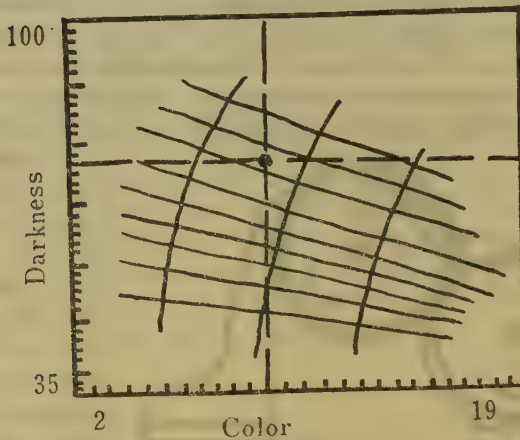



Fig. 9.

そのスケール面はFig.9.に示すように縦軸に明度をとり，目盛りは35から100までで酸化マグネシウムの白度を100としている，試料の白度の位置は黒い横線で磨りガラスのスケール面に自動的に投影されるようになつており，同じく彩度は縦線で投影され，その交点がその試料の等級(Grade)を決めることになる．彩度の目盛は2～19であり，米国の色彩学者Hunterの定めた目盛で，右へ行く程黄色が濃いことを示す．したがつて交点がスケール面の左上方に偏る程品質が良く，右下方に偏る程悪いということになる．なお原綿（米棉）の格付標準が変更さ

れれば，このスケールに画かれているChartも当然変更されることになつており，現在のものは1952年に制定され1953年より有効となつた．

試験を行うには適当量の試料（20g以上）を器械卓上の左側にあるガラスの小窓（15cm×10cm）に載せて一定重量で押しつけスィッチを入れるだけでよい．試験を行う場合特に注意をしなければならない点は．試験窓に押しつけた試料の面が一様の性質を持つ場合はよいが，万一大きな着色物が存在するとスケールの示度には当然その影響が加算されて表われるということである．

実験結果および考察

Table 1. Fiber length of Cotton.

Sample	Mean length (in.)		Longer than 1/2 in (%)		Shorter than 1/4 in (%)		Significant Fiber length (in.)		Contains of short Fiber (%)	
No. Variety	raw. cot.	abs. cot.	raw. cot.	abs. cot.	raw. cot.	abs. cot.	raw. cot.	abs. cot	raw. cot.	abs. cot.
A. Bengal	0.512	0.434	77.1	54.9	4.65	6.96	0.72	0.58	25.4	22.2
B. Bengal Deshi	0.487	0.505	72.7	50.8	3.41	4.79	0.65	0.66	20.6	19.4
C. Bengal	0.544	0.487	74.9	57.9	4.37	3.26	0.68	0.62	15.9	12.7
D. Bengal Super Fine	0.521	0.427	77.1	56.9	3.40	7.07	0.69	0.64	15.3	27.0
E. Bengal Choice	0.524	0.481	66.7	60.1	1.89	6.27	0.68	0.64	23.8	19.0
F. Pakistan	0.500	0.476	71.4	68.3	3.49	4.00	0.68	0.64	18.3	16.7
G. Punjap Deshi	0.497	0.458	63.6	56.3	3.2	3.1	0.86	0.74	35.0	27.0
H. Super Fine	0.486	0.456	67.7	41.8	3.6	5.6	0.7	0.69	24.2	27.4
I. Sind Deshi	0.540	0.456	58.2	50.9	5.5	3.5	0.72	0.66	22.6	25.4
J. Bengal Super Fine	0.563	0.535	78.3	72.1	3.73	4.15	0.73	0.71	17.7	20.6
K. Bengal Fine	0.492	0.469	68.9	58.4	3.26	6.08	0.67	0.67	17.7	24.6
L. Punjap Deshi	0.500	0.463	67.9	66.2	3.35	5.93	0.69	0.65	20.6	24.2
Average	0.514	0.471								
standard deviation	0.0249	0.0296								

Table 2. Strength, Finenes, and Color of Cotton.

Sample	Strength				Finenes		Color			
	Pressley index		1,000lb/sq. in.		μg/in.		S.L.M.		W	
No. Variety	raw. cot.	abs. cot.	raw. cot.	abs. cot.	raw. cot.	abs. cot.	raw. cot.	abs. cot.	raw.cot.	abs. cot.
A. Bengal	6.9	6.4	74.5	69.6	7.25	7.5	62.5	86.5	9.1	3.1
B. Bengal Deshi	6.9	6.5	74.4	70.3	7.55	7.6	62.0	88.0	10.1	2.8
C. Bengal	7.0	7.4	75.3	79.9	6.9	7.0	73.5	92.0	9.9	3.0
D. Bengal Super Fine	7.2	6.9	77.4	74.2	7.05	7.35	68.0	90.0	8.7	2.6
E. Bengal Choice	7.2	7.0	77.9	75.7	very coarse		67.0	86.5	8.4	2.4
F. Pakistan	6.7	7.3	72.1	78.5	7.05	7.5	70.0	90.0	9.0	3.0
G. Punjap Deshi	7.3	8.0	78.9	86.1	6.65	6.6	63.5	89.0	10.4	3.0
H. Super Fine	6.6	7.9	71.1	85.3	7.4	7.25	66.0	90.0	9.0	2.7
I. Sind Deshi	6.9	8.0	74.8	86.4	7.7	7.25	70.5	89.0	8.8	3.1
J. Bengal Super Fine	7.6	7.5	82.4	81.3	7.2	7.45	71.0	86.5	9.3	3.1
K. Bengal Fine	7.5	7.2	80.5	77.6	7.15	7.15	70.0	86.0	9.0	2.9
L. Punjap Deshi	7.1	7.8	76.2	84.5	6.95	6.65	72.5	86.5	9.1	2.7
			76.3	79.1	7.17	7.21				
			3.205	5.887	0.301	0.337				

Table 3.

Sample No. variety	Other Foreign Mater (raw cotton) Lint (%)	Non lint content (%)	Foreign mater (%)	Chemical Test Water. soluble substances J. P. VI (mg)	Copper number raw. cot.	abs. cot.	Fatty mater (U. S. P. XV) (mg) raw. cot.	abs. cot.	Alkalinity or Acidity J. P. VI	Residue on ignition Cl' SO₄'' J. P. V
A. Bengal	90.5	9.5	6.6	42.1	0.25	0.52 1.02	45.5	18.9	good	good
B. Bengal Deshi	91.3	8.7	4.7	34.3	0.30	0.60 1.07	41.0	17.5	〃	〃
C. Bengal	98.1	1.9	0.7	19.1	0.70	0.25 0.23	39.7	15.8	〃	〃
D. Bengal Supre Fine	90.3	9.7	6.9	20.6	0.50	0.08 0.67	36.7	14.	〃	〃
E. Bengal Choice	94.7	5.3	3.2	28.4	0.40	0.15 0.22			〃	〃
F. Pakistan	94.1	5.9	3.1	41.1	0.56	0.36 0.10			〃	〃
G. Punjap Deshi	85.7	14.3	10.5	18.7	0.44	0.09 0.13			〃	〃
H. Super Fine	89.3	10.7	8.4	20.5	0.64	0.36 0.14			〃	〃
I. Sind Deshi	96.5	3.5	2.4	27.7	0.32	0.06 0.13			〃	〃
J. Bengal Super Fine	94.3	5.7	3.6	25.8		0.08 0.12			〃	〃
K. Bengal Fine	92.9	7.1	5.5	23.3		0.24 0.18			〃	〃
L. Punjap Deshi	95.0	5.0	3.7	17.8		0.08 0.17			〃	〃

試験に当つては原綿及び脱脂綿をそれぞれ12検体ずつえらんだ．

繊維長の試験結果は予想通りU. S. P. XV の繊維長の規定中"1/2吋以上の繊維含有率60%以上"の部分に抵触するものが原綿で1検体，脱脂綿で8検体あつたが，"1/4吋以下のもの10%以下"の部分に抵触するものは一つもなく，短繊維含有率が最大のものでも7.07%で限度の10%までには充分余裕がある．

以上により製造技術未熟のため，操綿中に繊維が切れて短繊維含有率が多くなつたのではなくて，原綿自体に長繊維のものが少かつたことがわかる．したがつて長繊維系の米綿を使わず，短繊維系の印度綿を原料とするわが国において今後薬局方に繊維長の規定をのせるような場合にはこの点を充分考慮する必要があろう．

なおTable 2. 中で検体Bについて得られた平均繊維長が，原綿にくらべて脱脂綿の方が長いという結果は，他のものとくらべて解釈に苦しんだが一応ありのままの数値を記載した．（これは後に調査した結果検体を作製せるメーカーより，本製品のみは混綿品で原綿と品種が少し異つているとの報告があつた．）

強力は原綿と脱脂綿と比べてその結果に増減が認められる．減つているものの原因は，精練及び漂白の化学的操作において繊維が変質し酸化的に分解された為と考えられる．念のため銅価の測定を行つたところ，強力の減じた場合には銅価が増している，その例外は9例中1例だけであつた．

繊度も原綿から脱脂綿にした場合にその結果に増減が認められる．繊維素はアルカリにあうと膨潤して太くなり，酸性にて元に戻る．そのような化学的条件の他に繊維の表面や断面等の物理的状態や形状，密度の変化などなお今後検討を要する問題である．

不純物に関しては前述の Shirley Analyser から出てくる不純物をしらべると，比重の重い果皮（綿繊維をその中に含む蒴果の果皮で，栗の皮のような褐色を呈する）や種皮（種子即ち綿実の皮で，未熟綿の場合には Gining に際して綿毛と綿実が離れ難く，綿実が混入することが多い）の破片の他に繊維が見出される．これをルーペで

拡大して見ると必ずその一端に種皮の破片を附着している．即ちこれ等のものは諸種の物理的また化学的工程を経てもなおかつ繊維の附根部分にある種皮の小片が離れずに固着しているもので，いわゆる綿塊（Nepの訳語）はこのようなものを中心にして出来たものが相当数存在するものと思う．現在の局方での異物や綿塊の試験は標準品と比較することになつているが，及落の境界にあるものは判定が困難である．然しこの Shirley Analyser によれば数字に出てくるので判定が容易である．ただこの方法では繊維だけで出来ている綿塊は不純物として落ちては来ないから見逃すことになる．しかし前述したようにこのような品は実際にはそれ程多くはないし，原綿が類似したものであれば，種皮片を有する綿塊の数に対する繊維のみよりなる綿塊の数の比率がそれ程変動するとは考えられない．更に又このような繊維だけからなる綿塊は種皮片等の固形物を含む綿塊に較べて実用上の害作用も遙かに少ないと考えられる．したがつてもし経済的事情が許せば Shirley Analyser のような器械で異物を試験することが望ましい．

色相の試験も前述のように原棉の種類が変れば条件が変るかも知れないので，全般的な比較よりも個々の試料における原棉と脱脂綿との比較により多くの意味を持つであろう．

本研究を行うに当つては試料を製造し，提供された西部衛生材料協同組合及び一部試験の実施を担当された財団法人日本紡績検査協会の終始変らぬ協力を得た．両団体に対し深甚な謝意を表する．

文　　献

1) United States Pharmacopeia XV, P. 926.

Summary

We studied the physical properties of the absorbent cotton (product) and raw cotton (material).

Item	Apparatus
1) Fiber Length	Duplex Fiber Length Sorter
2) Fiber Strength	Pressley Fiber-Strength Tester
3) Finess	Micronaire Tester
4) Foreign Materials	Shirley Analyser
5) Color	Cotton Colorimeter

1) Fiber Length : 9 of the 24 samples do not satisfy the U. S. Pharmacopeial requirement, because the Japanese absorbent cotton are made from Indian and Pakistan cotton which are more shorter than the american cotton in it's fiber length.

2) Fiber Strength : The average value of the total samples of the absorbent cotton and that of raw cotton are 79.1 and 76.3 respectively. There are significant relations between the fiber strength and the copper number.

3) Finess : Not only this apparatus must be used for the Upland cotton solely, but also there are many factors that alter the condit ions, therefore we can't conclude the relation between the materials (raw cotton) and the products (absorbent cotton).

4) Foreign Materials : From the stand point of exact determination, it is most convenient to adopt the Shirley Analyser which is mentioned in this report, because the result are indicated numerically.

5) Color : This factor is determined by the Cotton Colorimeter numerically. This test is performed in one minute, therefore it is very effective method in many cases.

Recieived June 18, 1957

重金属の経皮吸収に関する研究

市川重春，池田良雄，南城　実，
大森義仁，林　悦子，磯野千冬，
狩野静雄，吉本浜子，小山常正*

Experimental Studies on Dermal Absorption of Heavy Metals.

Shigeharu Ichikawa, Yoshio Ikeda, Minoru Nanjo,
Yoshihito Ōmori, Etsuko Hayashi, Chifuyu Isono,
Shizuo Kanō, Hamako Yoshimoto, and Tsunemasa Koyama

まえがき　医薬品ならびに化粧品の製造に当つては，種々の重金属を含有する原料が用いられ，またこれらのものを含む製剤もあり，その経続使用により，皮膚粘膜及び各種臓器組織に機能的乃至器質的な障害を来すことが報告されている．

とくに，鉛及び砒素等は化粧品中に混在することが多く，これらの重金属が皮膚に投与されるときは，皮脂腺あるいは毛嚢を通じて吸収され，生体に障害を及ぼすことが考えられるが，経口投与等による試験法以外の研究報告が少ないので，ここに検討を加えるべく，経皮投与試験を行なつた．

実験方法

検体としては，鉛の経皮吸収試験には，市川等により精製された硝酸鉛を，水溶液またはコールドクリーム基材中に混合した形のものとして，また砒素の経皮吸収試験には亜砒酸を親水軟膏に混じたもの及び局方亜砒酸カリ液を用いた．

実験に使用した動物は，成熟ラット及びウサギで，次に述べるような方法で検体を投与した後，体重増加，喫食，運動状態及び中毒症状の有無等につき観察し，随時，採血及び採尿を行ない，検体投与による重金属の増加等を定量により検討し，死亡例または解剖例については，臓器組織の肉眼的及び病理組織的検査を行なつた．

実　験 1.　健康雄性ラット，体重95～194gのもの70例を用い35例を被検群とし，残りを対照群とし，被検群は硝酸鉛水溶液〔30％W/V〕を1日1回0.2ccずつ，電気バリカンで剪毛した背部皮膚にほぼ均等に塗布し7週に亘る経皮投与を行ない，1週間毎に両群5例ずつエーテル麻酔下に解剖し，解剖時に各ラット腹部大動脈より採血し鉛の定量を行なつた．

実　験 2.　健康雌性ウサギ体重1.2～1.7kg 5匹を用い，硝酸鉛5を，蜜蠟9，固形パラフィン8，ワセリン10流動パラフィン48，ラノリン1，水22.9，硼砂0.5，石鹸末0.1，及び香料0.5よりなるコールドクリーム基材に混じ，その0.5gを，1週間間隔で右耳介内側に広く塗布し，検体塗布直前に毎回10ccずつ心穿刺により採血し，鉛の定量にあて，また，1カ月後に2匹，残りは3カ月後に解剖した．

実　験 3.　健康雌性ウサギ2.2～2.8kgのもの8匹を2群に分け，1群は対照とし，亜砒酸（20％W/W）含有親水軟膏を毎週1回0.5gずつ右耳介内側に塗布し，2カ月に亘り実験を行ない，1例は12日後，他の1例は1カ月後，残り2例は2カ月後に解剖した．また，実験2と同様に検体塗布直前，毎週1回ずつ10ccずつ採血し，砒素の定量にあてた．

実　験 4.　体重2.45～2.70kgの成熟雄性ウサギ3匹を用い，背位に固定し電気バリカンで，腹部を7×10cm位の広さに剪毛し，傷のないことを確認した後，パラフィンを用いて5×8cmの長方形の枠を作り，周辺の毛と共に腹壁皮膚に固定し，この枠内に，0.5gの脱脂綿をほぼ均等に敷き，そこに検体の局方亜砒酸カリ液5ccを注入し，皮膚と脱脂綿を6時間に亘り接触させた．

検体投与前日より　ウサギを1匹ずつ代謝箱に容れ24時間尿量を測定し，その後6時間に亘り背位固定の下に検体を経皮投与した，この投与時間中は，ネラトンカテーテル No. 3 で導尿を行ない，終了後は，パラフィン枠

註 * 資生堂製造部長．

を外し，検体投与部位を水で洗滌清拭し，再び代謝箱で採尿した．その後7日間に亘り，毎日24時間尿量を求め尿の一部は砒素の定量にあてた．

鉛及び砒素の定量法

1．血液中の鉛定量試験法

血液5cc又は10ccを磁製蒸発皿中にとり，注意して530°C以下で灰化する．灰分に1％硝酸10〜15ccを加え注意して加熱し，殆んど蒸発乾固する，残留物を1％硝酸15ccで加温溶解して沪過する．沪紙上の残留物は1％硝酸5cc次いで蒸留水10ccで洗滌する．沪洗液を合して，内容100ccの分液ロートにとり，クエン酸アンモニウム液10cc，塩酸ヒドロキシルアミン液2ccを加える．次にフェノールレッド液2滴を加え液が赤変するまで強アンモニア水を加え，シアン化カリウム液2ccを加え直ちにこの溶液を抽出用ジチゾン液の固有の緑色となるまで続ける．ここに集めた抽出液を1％硝酸20ccで30秒間ふりまぜクロロホルム層を去る．この酸液に正確に標準ジチゾン液を下表の割で加え，アンモニア性シアン化カリウム液4ccと共に1分間ふりまぜる．

Pb. γ	Dithizone Conc mg/cc	ジチゾン液cc
0〜5	0.4	5
10	0.4	10
20	0.8	10
50	0.8	25
100	1.0	30
200	2.0	30

このジチゾン抽出液は比色管に貯え新たに別の比色管に標準ジチゾン液5cc及びアンモニア性シアン化カリウム液4ccをとりこれに標準鉛液をミクロビューレットより先のジチゾン抽出液の色と同じになるまで滴加してこれに要した標準鉛液の量から血液中の鉛量を定量する．

2．試　薬

①**クエン酸アンモニウム液**　クエン酸40gを水90ccに溶かしフェノールレッド液2〜3滴を加え液が赤色を呈するまで強アンモニア水を注意して加える．これを抽出用ジチゾン液20ccずつで液が固有の緑色を保つに至るまで抽出をつづけ鉛を完全に除去する．

②　**10％シアン化カリウム液**　シアン化カリウム50gを水に溶かして100ccとし，この液をジチゾン液で前記のクエン酸アンモニウム液と同様に鉛を除き，更にクロロホルムを用い液中に残存するジチゾンを抽出する．最後に水でうすめて100cc中シアン化カリウム10gを含むようにする．

③　**アンモニア性シアン化カリウム液**　前記のシアン化カリウム液20ccに強アンモニア水15cc及び水を加えて100ccとする．

④　**塩酸ヒドロキシルアミン液**　塩酸ヒドロキシルアミン20gを水に溶かして約65ccとし分液ロートに移し，チモールブルウ液数滴を加えて液が黄色を呈するまで強アンモニア水を加える．次に4％ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム液10ccを加えてよくふりまぜ5分間放置する．この液を毎回クロロホルム10〜15ccで抽出し，その抽出液5ccに稀硫酸銅液を加えるとき黄色を呈しなくなつたらこれを終末点とする．このヒドロキシアミン液に赤色となるまで稀塩酸を加え更に水でうすめて100ccとする．

⑤　**抽出用ジチゾン液**　ジチゾン30mgをクロロホルム1lに溶かし95％アルコール5ccを加え冷所に貯え用に臨んで本液の必要量をとりその約半量の1％硝酸とふりまぜジチゾン液を洗つた後硝酸を除いてから用いる．

⑥　**標準ジチゾン液**　ジチゾン10mgをクロロホルム1lに溶かし鉛を含まないしや光した共栓ビンに入れ冷所に貯える．

⑦　**標準鉛原液**　硝酸鉛159.8mgを精密にはかり硝酸1ccを加え水100ccに溶かしてから水でうすめ全量1lとする．本液の調製及び保存用ガラス器具は鉛分を溶出しないものを用いる．

⑧　**標準鉛液**　標準鉛原液（10γ/cc）10ccを精密にとり1％硝酸を加えて100ccとする．本液中の鉛の含量は1γ/ccである．

2．血液及び尿中の砒素定量試験法　試料を（血液は7.6cc〜10.0cc；尿は33cc〜65cc）300ccのケルダールフラスコに取り，硫酸7cc及び硝酸7ccを加え，亜硫酸ガスが発生するまで加熱する．さらに硝酸3.5ccを加え，ふたたび亜硫酸ガスが発生するまで加熱する．試料が完全に溶解し，液が黄色となるまでこの操作を繰返す．ついでこれに硝酸1容に60％から70％過塩素酸1容の割合の混液7ccを加え，液が無色又は淡黄色となるまで加熱する．冷後これに蓚酸アンモニウム飽和液15ccを加え，もとの全容量まで加熱して濃縮する．さらにこの操作を2〜3回繰り返し，冷後水を加えて全量を20ccとする．この液を検液とし，日本薬局方一般試験法の第15項砒素試験法に準じて試験する．

実験結果

実験 1.

30%（W/V）硝酸鉛水溶液 0.2cc ずつ毎日1回経皮投与したラットの体重増加は表1に示したように極めて順調で，各被検群の各週後の体重平均値を対照群と比較しても，その増減量は差が著しくなく，この程度の検体経皮投与では，ラット体重増加に影響を及ぼすものとは断定し難い.

また，被検群各ラットの喫食状態及び運動状態も，対照群と同様に良好で，検体投与によると思われる異常症状は，全期間を通じて認められなかつた.

表 1　硝酸鉛（30%,0.2cc/day）連続塗布各週後におけるラット体重

試験群					対照群				
群	週	試験開始時の体重 (g)	殺戮時の体重 (g)	増加量 (g)	群	週	試験開始時の体重 (g)	殺戮時の体重 (g)	増加量 (g)
1	1	106.4	119.2	12.8	1	1	105.0	125.7	20.7
7	2	169.8	202.2	32.4	7	2	171.8	196.4	24.6
3	3	112.8	157.4	44.6	2	3	101.8	162.8	61.0
4	4	118.4	180.8	62.4	3	4	110.2	183.5	73.3
5	5	110.8	204.8	94.0	4	5	110.6	200.0	89.4
6	6	111.2	224.0	112.8	6	6	113.7	237.0	123.3
2	7	107.0	225.8	118.8	5	7	108.0	227.8	119.8

被検群のうち，1例及び対照群のうちの1例がそれぞれ，実験開始後18日及び14日目に肺炎により死亡したほか，全例解剖時まで生存した.

エーテル麻酔下に腹部大動脈より脱血死亡させた各例につき，主要臓器の肉眼並びに触手による検査を行なつたが，対照群のものと同様に特に異常は認め得なかつた.

また，各群の主要臓器原重量及び体重100gに対する重量は表2に示すごとくで，心臓では対照に比し大差なく，肝臓では5週間後までは対照よりやや大きな値を示し，脾臓ではむしろ3週間以後にこのような変化を認め，腎臓では，いずれもやや大きな値を示したが，いずれも著明な差とはいい難く，検体投与日数の増加と共に臓器重量に一定の変化を来す傾向は認められなかつた.

表 2　硝酸鉛（30%溶液,0.2cc/day）連続塗布ラットの各臓器重量

週	臓器 / 体重 上段：試験群 下段：対照群	心臓	肝臓	脾臓	肺臓 左	肺臓 右	腎臓 左	腎臓 右
1	123.0	0.6 / 0.49	6.9 / 5.57	0.7 / 0.57	0.4 / 0.33	0.7 / 0.57	0.7 / 0.53	0.7 / 0.53
	120.5	0.6 / 0.46	6.2 / 5.09	0.9 / 0.75	0.3 / 0.25	0.6 / 0.50	0.6 / 0.50	0.6 / 0.50
2	180.5	0.8 / 0.46	9.1 / 5.03	1.0 / 0.53	0.8 / 0.42	1.2 / 0.65	0.9 / 0.51	0.9 / 0.51
	165.0	0.7 / 0.43	7.0 / 4.24	1.0 / 0.60	0.5 / 0.31	1.1 / 0.67	0.8 / 0.46	0.8 / 0.46
3	145.0	0.7 / 0.45	6.9 / 4.95	1.4 / 0.75	0.4 / 0.24	0.8 / 0.52	0.7 / 0.49	0.8 / 0.52
	159.0	0.8 / 0.47	6.5 / 4.09	0.7 / 0.42	0.4 / 0.26	0.6 / 0.38	0.7 / 0.44	0.7 / 0.44
4	154.0	0.8 / 0.49	8.8 / 5.62	1.0 / 0.65	0.5 / 0.29	0.8 / 0.55	0.9 / 0.59	0.9 / 0.59
	153.8	0.8 / 0.49	6.6 / 4.30	0.7 / 0.46	0.4 / 0.27	1.0 / 0.63	0.6 / 0.39	0.6 / 0.39
5	206.0	0.9 / 0.44	8.7 / 4.23	0.9 / 0.42	0.4 / 0.20	0.7 / 0.34	1.0 / 0.49	1.0 / 0.49
	171.0	0.7 / 0.41	6.5 / 3.80	0.5 / 0.29	0.9 / 0.53	1.4 / 0.82	0.7 / 0.41	0.7 / 0.41
6	235.0	1.0 / 0.43	10.5 / 4.47	0.7 / 0.31	0.4 / 0.17	0.8 / 0.35	0.9 / 0.39	0.9 / 0.39
	229.5	1.1 / 0.46	10.4 / 4.51	0.6 / 0.24	0.5 / 0.20	0.8 / 0.33	0.9 / 0.39	0.8 / 0.35
7	222.0	1.1 / 0.50	9.8 / 4.41	0.6 / 0.26	0.4 / 0.18	0.9 / 0.39	1.1 / 0.50	1.0 / 0.50
	228.5	0.9 / 0.40	9.0 / 4.90	0.5 / 0.22	0.5 / 0.22	1.0 / 0.42	0.9 / 0.39	0.9 / 0.39

枠内数値のうち斜線上部は原重量(g)を，下部は対100g体重重量(g)を示す.

なお，ヘパリンで凝固防止して，腹部大動脈より採血した硝酸鉛経皮投与ラットの血中鉛含有量の定量結果は表3に示すごとくで，3週以後になると，被検群ラット血液中の鉛含量は，対照に比し明らかに増加していることが認められたが，この量も，経過日数の増加と共に増大する傾向は認められなかつた．

表 3　硝酸鉛連続塗布ラット血液中の鉛含量

検体番号	採血年月日 経過日時（週）	試験群	対照群
3	30. 3. 1 (3)	13.16 PPm	0.60PPm
4	30. 3. 8 (4)	—*	0.75PPm
5	30. 3.15 (5)	8.75 PPm	0.62PPm
6	30. 3.22 (6)	7.5 PPm	1.0PPm
7	30. 3.29 (7)	10.0 PPm	1.5PPm

註：1. 試験群及び対照群4～5匹より採血したものを均一に混和した後5cc宛4検体をとりその平均値を求めた．
2. * 印は灰化温度が580°Cまで上昇し過ぎたので結果が一致せず省略した．

病理組織学的検査により，肝臓では，1週間後の1例に肝細胞の核分裂を認め，2週間後の1例には，肝細胞核の水泡性に膨大するものがあり，他の1例では核分裂を認めた．3週間以後になると肝細胞の大小不同，核分裂を認める外，一般に膨大したものが多く．所々散在性に毛細管が拡張し肝細胞の脱落したものや，小葉中心部が萎縮して小空泡を認めるもの等がある．

腎臓では1～2週間後には対照に比し著変なく，3週後の1例に細尿管の核の大小不同を認め，4週間後には2例に細尿管上皮の空胞変性，管内に均等性黄色物質を入れているもの等があり，5週間群では間質の浮腫，細尿管の濃縮溷濁等を認めたが，この変化は対照群にも認められるので，判断はつけ難い．

脾臓では2週以後に，多くの例では胚中枢が明瞭となり，3週以後はリンパ沪胞が一般に増大している．

実　験　2.

硝酸鉛5％（W/W）含有コールドクリーム基材を毎週1回右側耳介内側に0.5gずつ塗布したウサギは試験開始14日位は体重の増減不定で，うち1例は試験開始翌日から下痢を起し10日後に死亡したが，残りのものは喫食状態も良く，その後順調に体重増加し，全期間を通じ，塗布局所の変化または中毒症状等を認めなかつた．

1カ月及び3カ月後の解剖例の主要臓器には肉眼的に著変なく，早期死亡の1例を除き臓器重量も体重1kg当りの量に換算するときは著しい相異もなかつた．

また，毎回検体塗布直前に，ヘパリン処理注射筒を用い，10ccずつ心臓穿刺により採血し，鉛の定量を行なつたが，この結果は表4に示す如くで，検体投与後の経過日数の増加とともに血中の鉛含有量が増加する傾向は認められなかつたが，1週間後にすでに相当の増加を来した例もあり，その後9週位まで種々の値を示したが，この間血中鉛量が減少乃至は増加せぬままで経過する傾向はなかつた．

表 4　5％硝酸鉛含有コールドクリーム塗布試験におけるウサギ血液中の鉛含量

過経日数(週) 採血年月日 ＼ 供試番号	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5
30.12. 9	* 0.1 PPm	* 0.1 PPm	* 0.15 PPm	* 0.7 PPm	* 0.8 PPm
(1) 30.12.16	0.9 〃	1.0 〃	0.1 〃	0.3 〃	0.3 〃
(2) 30.12.23	0.15 〃	0.2 〃	0.05 〃	0.05 〃	/
(3) 31. 1.13	0.7 〃	0.8 〃	0.1 〃	0.7 〃	/
(4) 31. 1.20	0.7 〃	/	0.8 〃	/	/
(5) 31. 1.27	0.3 〃	/	0.3 〃	/	/
(6) 31. 2. 3	0.1 〃	/	0.2 〃	/	/
(7) 31. 2.10	0.3 〃	/	0.8 〃	/	/
(8) 31. 2.17	0.2 〃	/	0.1 〃	/	/
(9) 31. 2.24	0.2 〃	/	0.7 〃	/	/
(10) 31. 3. 2	0.1 〃	/	0.1 〃	/	/
(11) 31. 3. 9	0.1 〃	/	0.1 〃	/	/

註　：斜線は剖検のため解剖No. 5は10日目に死亡　*印は検体塗布試験開始前の血液5 cc中の鉛濃度（PPm）

実　験　3.

実験2同様20％（W/W）の割に亜砒酸を含む親水軟膏を0.5gずつ毎週1回右側耳介内側面にほぼ均等に塗布したウサギは，前述の鉛の実験の場合と異り，検体塗布局所に5～6日頃から発赤が現われ，漸次不正形の潰瘍を作り，痂皮でおおわれるようになつた．この潰瘍は経過と共に周辺に拡がり，他部に発生したものと癒合する傾向を認め，耳介内側面より外側に向つて深部に侵蝕し，ついには穿孔する例もあつた．痂皮の内部は，汚穢な膿様分泌物で被われ，潰瘍周辺部は発赤しやや硬結を認めた。対照群ではこのような変化は全く認められなかつた．

附図　20％亜砒酸親水軟膏経皮投与後の局所の変化

対　照　例

被検例（12日後）

局所の変化の特に著しい1例は12日後に解剖し，また対照群の1例は42日後採血時に死亡したが，その他の例は共に，体重増加，喫食並びに運動状態等は対照と同様に良好で，被検群にも特異な中毒症状等は認められなか

つた.

また，それぞれ1ヵ月及び2ヵ月後に解剖した各例の主要臓器の肉眼所見では著変なく，その重量も個体差はあるが，検体投与により著明な変化を来す傾向は認められなかつた.（表5参照）

表5　20%亜砒酸塗布ウサギの臓器重量表

	No.	体重	肝臓	脾臓	心臓	腎臓		肺臓	
						左	右	左	右
砒素塗布群	1	3.30	79.7／23.3	1.7／0.52	9.2／2.79	7.9／2.39	7.4／2.24	5.0／1.52	8.5／2.58
	2	2.64	96.9／36.7	3.0／1.14	11.2／4.24	7.9／2.99	7.3／2.77	16.4／6.21	20.2／7.65
	3*	2.28	69.2／30.4	2.0／0.89	7.0／3.10	8.4／3.68	8.6／3.77	5.5／2.41	7.7／3.38
	4	2.28	93.0／40.8	1.9／0.83	9.9／4.34	8.0／3.51	7.5／3.29	4.4／1.79	6.9／3.03
対照群	1	2.20	57.9／26.3	1.3／0.59	5.3／2.41	6.2／2.82	5.8／2.64	3.7／1.64	5.7／2.63
	2	2.30	57.2／24.9	1.3／0.57	6.0／2.60	5.4／2.34	5.2／2.26	3.8／1.65	6.3／2.74
	3*	3.13	123.0／39.3	2.7／0.16	9.2／2.94	9.6／3.07	9.4／3.00	8.5／2.72	12.6／4.03
	4	2.78	65.6／23.6	1.5／0.54	8.8／3.17	6.5／2.34	6.4／2.30	4.5／1.62	8.2／2.95

枠内数値のうち斜線上部は原重量(g)，下部は対1kg体重重量(g)を示す.　　* 死亡例

各例より各時期に得られた血液中の砒素含量は次の表6に示すごとくで，30日後の被検群血中の砒素含量は対照に比し著明に増加したがその後37日及び59日の定量結果からは，対照と著明な差はなく，漸次増加することは認められなかつた.

表6　20%亜砒酸塗布ウサギ血液中の砒素含量

経過日数		0	30	37	59	備考
砒素塗布群	A-1	1.7	17.4	5.3	1.3	
	A-2	9.5	25.0	3.6	0.9	
	A-3	1.4	—	—	—	12日後に死亡
	A-4	2.2	32.3	—	—	
対照群	C-1	5.6	—	—	—	
	C-2	2.7	—	—	—	
	C-3	—	—	6.0	—	42日後採血時に死亡
	C-4	—	5.5	—	1.0	

註：表中の数字は血液10cc中のμg量

実験 4.

実験3で亜砒酸の経皮投与後に血液の他皮膚における砒素が増加することをも認めたが，この場合，形成された潰瘍からの吸収も考えられるので，健康皮膚に短時間，亜砒酸カリ液の接触を行ない，尿中への砒素の排泄を観察した.

1週間に亘る観察期間中，ウサギに何等変化または異常を認め得なかつた.

尿量は，検体投与前24時では116～205ccであつたが．背位に6時間固定し検体を塗布した際には，翌日の尿量は減少したがその後は恢復した.

尿中砒素量は表7に示すごとく検体投与前は10cc中亜砒酸として0.5～1.9μgを含有したが，投与後24時間ですでに増加を示し2～3日後の排泄は最大となり5～7日で漸次投与前の値に復する経過を示した.

表7　亜砒酸カリ液5cc経皮投与ウサギの尿量及び尿中砒素含有量

No.	1				2				3			
経過日数	体重 (kg)	尿量 (cc)	尿中砒素 (AS_2O_3)量(μg) 10cc中含有量	総量	体重 (kg)	尿量 (cc)	尿中砒素 (AS_2O_3)量(μg) 10cc中含有量	総量	体重 (kg)	尿量 (cc)	尿中砒素 (AS_2O_3)量(μg) 10cc中含有量	総量
	2.70				2.45				2.50			
検体塗布	2.75	116	1.9	22.0	2.50	132	0.5	6.6	2.50	205	0.8	16.4
1	2.70	30	1.7	5.1	2.56	45	2.4	10.8	2.50	70	4.0	28.0
2	2.70	125	53.2	665.0	2.50	215	4.7	101.0	2.50	200	4.5	90.0
3	2.60	115	23.3	267.9	2.50	90	6.7	57.3	2.55	40	12.1	48.4
4	2.70	170	4.6	78.2	2.30	130	1.4	18.2	2.50	240	3.3	79.2
5	2.60	270	1.7	45.9	2.40	260	0.6	15.6	2.35	250	0.9	22.5
6	2.65	190	2.0	38.0	2.48	205	0.6	12.3	2.38	195	0.7	13.6
7	2.63	195	1.2	23.4	2.45	185	0.6	11.1	2.40	235	1.5	35.2

これら各試験における病理組織学的検査の結果は別に発表の予定である．

考　察

鉛及び砒素の経皮吸収については適当な軟膏或いは発疱剤と併用すればある程度吸収されるとの見解がとられている（Goodman & Gilman[1]）．

しかし，鉛の吸収についてはその可能性が少ないとされ，とくに実験的に尿中排泄量からその経皮吸収を推定することが困難であり，且つ，一度吸収された鉛は，先ず循環系に入り次いで軟部組織に吸収され再び循環血中に出て硬組織に沈着貯蔵されることが明らかにされているので，われわれは，血液からの検出を行なつて吸収の有無を検討した．

今回のラット及びウサギを用いた両実験では，その投与量及び溶媒乃至混入基材の差はあるが，いずれの場合も1～3週間位で血中の鉛含量が対照乃至は実験開始時の値に比し相当高くなつているので，鉛を無機塩類の水溶液またはコールドクリーム等の形で相当大量投与するときは，経皮吸収が行なわれ得るのではないかと考えられる．

人体における砒素の経皮吸収に関してはLeva[2]の実験がある．すなわち，彼は1l中19mgの亜砒酸を含む温泉浴を行なうと，3～4日後頃から尿中の砒素排泄量が著明に増加することを認めている．今回20%の亜砒酸を含有する親水軟膏を1週1回0.5gずつ経皮連続投与したウサギの血液では1カ月後対照に比し著しく高い値を示したがその後は経過とともに必ずしも高い値を示さなかつた．しかし，別に行なつた実験から皮膚の砒素含量が検体の経皮投与後に増加することを認め，しかも吸収された砒素は，先ず血中に入り，次いで主要臓器或いは，皮膚及び骨に漸次移行することが明らかにされているので，今回の実験では経皮吸収された砒素は，主として先ず血中に入り，次いで一時的に皮膚に貯えられたものとも解釈される．ただし，この実験では，検体塗布局所に潰瘍を生じたので，このような損傷部位から砒素が吸収されたとも考えられぬことはない．

しかし，次の実験で損傷を受けていない皮膚に亜砒酸カリ液を投与して局所に何等変化を伴なわない場合でも翌日から尿中に砒素の排泄が増加することを認めた．一般に砒素を1回投与し，これが吸収されるときは2～8時間頃から尿中に排泄が始まり，約10日位で全量が体外に出ることが明らかにされているので，今回の実験結果から，経皮投与された砒素が吸収されたものと考えられる．

むすび

硝酸鉛を水溶液及びコールドクリーム基材に混じた形で，ラット及びウサギに連続経皮投与した結果，その後血液中の鉛含量が増加することを認めた．

また，亜砒酸を20%（W/W）の割合で含有する親水軟膏をウサギ耳介内側に連続経皮投与したところ，投与部位に5～6日頃から潰瘍を形成し．30日後の血液中の砒素含有量は対照に比し著しく増加した．

亜砒酸カリ液5cc6時間経皮投与ウサギでは，尿中砒素排泄量が翌日から激増し，2～3日後に最大となり，

5～7日後に漸次試験前の値に復した.

これらの結果から，医薬品または化粧品中に含まれる鉛及び砒素は適当な条件下では生体の健康皮膚から吸収され得るものと考えられる.

本研究は厚生科学研究費の補助を受けた.

本実験を行うにあたり終始御指導を受けた刈米達夫所長に感謝する.

文献

1) Goodman, L. S. & Gilman, A. : "The Pharmacological Basis of Therapeutics" Mac Millan Co. Press. 1955, P. 952.

2) Leva, J. : *Münch. Med. Wnschr.* 76, 1368 (1929).

Summary

After dermal administration of lead nitrate as 30% aqueous solution or as mixture ni cold cream base to rats or rabbits, lead content of whole blood increased spontaneously or continuously compared with control animals.

Twenty percent hydrophilic ointment of arsenic trioxide administered on the auricle of rabbits formed necrotic ulcer in that site within several days, and blood content of arsenics as arsenical trioxide increased remarkably after 30 days.

Administration of Fowlers' solution (J. P. 6) on intact skin of rabbits for 6 hours caused increase of urinary excretion of arsenics within 24 hours, reached maximal excretion in 2 or 3 days and then recovered gradually to normal value.

Received June 18, 1956

アニリン系色素の経皮吸収に関する研究

市川重春, 藤井清次, 池田良雄,
南城　実, 神蔵美枝子, 大森義仁,
林　悦子, 加藤三郎, 磯野千冬,
狩野静雄, 吉本浜子, 小山常正*

Experimental Studies on Dermal Absorption of Aniline Dyes.

Shigeharu ICHIKAWA, Seiji FUJII, Yoshio IKEDA,
Minoru NANJŌ, Mieko KAMIKURA, Yoshihito ŌMORI,
Etsuko HAYASHI, Saburo KATŌ, Chifuyu ISONO,
Shizuo KANŌ, Hamako YOSHIMOTO and Tsunemasa KOYAMA

まえがき　医薬品または化粧品として使用されるアニリン系色素のあるものについての毒性に関する報告，あるいはその経皮吸収に関する業績は，従来，わずか乍ら発表されてはいるが，いずれも短期間使用に関するもので，その継続使用とくに経皮投与による実験はほとんど見当らない．また，口紅その他化粧品として使用される色素に関する毒性に関してもその成績は必ずしも一致していない．したがつて，われわれはこの目的に使用される2，3種の色素を実験動物に経口乃至経皮投与し，その生体に及ぼす影響を観察し，一部結果を得たので報告する．

実験方法

実験 1.　ローダミンBの経口急性毒性試験

(1) マウスを用いる実験

体重15～20gの成熟雄性マウス1群6匹ずつ用い，検体（保土谷化学製品を精製したもの[1]．純度93%）は10%アラビアゴム懸濁液とし，体重1kg当り50mg以上600mgまでは50mg間隔に700mg以上1,100mgまでは100mg間隔で，胃ゾンデを用いて経口投与し72時間に亘り，死亡率，中毒症状を観察し，さらに主要臓器の肉眼的検査を行なつた．

(2) ラットを用いる実験

(i) 体重107～230gの成熟雄性ラット1群5匹ずつ，13群を用い，検体の上記同様懸濁液を体重1kg当り100mg以上1,100mgまでは100mg間隔で，またそれ以上は1,500mgまでは200mg間隔で経口投与し，実験(1)と同様な観察を24時間に亘り行なつた．

(ii) 体重190～243gの成熟雄性ラット1群5匹のもの5群を用い，同様に調整した検体懸濁液を体重1kg当り100以上500mgまで100mg間隔で1回投与し7日後に生存例を撲殺解剖し病理組織学的検査にあてた．

実験 2.　ローダミンBの経皮投与実験

体重1.62～1.89kgの成熟雌性ウサギを1群3匹ずつの4群に分け，1群は対照とし，残りの3群にはそれぞれローダミンB飽和水溶液（0.78%），その10倍液及びその100倍稀釈液を1日1回0.5ccずつ，電気バリカンで剪毛した外傷のない背部皮膚5×7cm位の部分に塗布し，4週間に亘り観察し，1週間毎に1回心穿刺により15ccずつ採血し，検体の検出にあてた．

抽出法

血液中よりローダミンBを抽出する方法として，(1)血液にアルカリを加え有機溶媒で抽出する方法，(2)血液を乾固後残留物を溶媒で抽出する方法，(3)毛糸に染着させて抽出する方法等について検討したが，(2)及び(3)法は多量の色素が存在する場合は有効であつたが，微量の場合は満足な結果が得られなかつた．しかし(1)法は微量の場合でもやや満足すべき結果が得られたので本法を採用した．多数の溶媒を用い，ローダミンB添加血液の抽出実験を試みた結果，抽出溶媒としてエーテル（ローダミンB回収率70%）が適当と認められたので，これを用いて

註 * 生堂製造部長

次のように行なつた．

血液5ccをとり，N/10水酸化ナトリウム液同量を加え，毎回エーテル10ccずつで3回抽出し，エーテル液を合し蒸発して約10ccとした後，エーテル液をN/10水酸化ナトリウム液0.5ccずつで2回洗つた．次にエーテル液をN/100塩酸で最初2ccずつで2回，さらに1ccずつで4回抽出した．酸性液を合し水浴上で乾固し残留物を少量のアルコールに溶かして検出に用いた．ローダミンBの同定は沪紙クロマトグラフィー（一次元上昇法）によつた．（展開剤[2]，アルコール：アンモニア水：水　3.0：8.0：13.0，東洋沪紙No. 50，室温）本法によるときは血液5cc中に存在するローダミンBは0.1γまで検出可能であつた．

実　験　3.　オレンジⅡの急性毒性試験

体重15～20gの健康雄性マウス1群6匹を用い検体オレンジⅡ（D & C Orange No. 4，米国H. Kohnstamm会社製品，純度94%）はマウス体重1kg当り1.25，1.50，1.75，2.00，2.25，2.50，2.75，3.00及び3.50gの割合で水溶液とし頸背部皮下に注射した．その後1週間に亘り，中毒症状，死亡率及び一般状態等を観察した．

実　験　4.　ローダミンB及びオレンジⅡの経皮投与実験

健康成熟雄性ウサギ体重1.21～1.70kgのもの1群5匹とし2群を用い，検体として，ローダミンステアレート及びオレンジⅡアルミニウムレーキを，それぞれ15%の割合に，蜜蠟10，カルナバ蠟1，ラノリン6，ヒマシ油67，香料1%の口紅基材に均等に混入し，ウサギ右耳介内側面に1週間1回0.5gずつの割合で，この混合製品を広く塗布し，実験2と同様に1週間間隔で10ccずつの心臓よりの採血を行ない，検体の検出にあてた．また，解剖時，膀胱及び直腸から採取した，屎尿についても両色素の検出試験を行なつた．

抽　出　法

ローダミンBステアレートの抽出は実験2と同様の方法を用いたが，オレンジⅡについては次の如く行なつた．

血液10ccに水を加えて100ccとし，この液にn-ブタノールを加えて振つた後遠沈管に入れ遠心し2層に分離しブタノール層を分取する．ブタノール層を水浴上で乾固し，残留物を少量の水に溶かし色素の検出に用いた．

本法によるとオレンジⅡの回収率は約82%であつた．

オレンジⅡの同定はローダミンBと同様沪紙クロマトグラフィーによつたが，展開剤[3]は次のものを用いた：n-ブタノール：アルコール：N/2アンモニア水(6：2：3)，n-ブタノール：アルコール：N/2酢酸（6：2：3），n-ブタノール：ピリジン：水（6：3：4），n-ブタノール：ピリジン：N/2アンモニア水（6：3：4），また屎尿については血液と同様の抽出法を用いた．

実　験　5.　ローダミン6GCPの急性毒性試験

体重18～22gの成熟雄性マウス1群6匹の9群を用い，検体（住友化学製品を精製したもの純度82%）は蒸留水懸濁液としてマウス体重1kg当り50～450mgずつ50mg間隔で経口投与した．その後7日間に亘り中毒症状ならびに死亡率等を観察し致死量を求めた．

実　験　6.　ローダミンB及び6GCPレーキの経皮投与実験

ローダミンB及び6GCPは，ともにAl及びBa混合レーキ（レーキ中の純色素含量は10.0%）とし，ヒマシ油53，蜜蠟7.8，パラフィン9.0，カルナバ蠟4.2，ラノリン3.0，ワセリン3.0中にレーキを10%の割合で混入したものを検体とし，体重2.24～2.75kgの雄ウサギ1群4匹のもの3群を用い，うち1群は無処置対照とし，残り2群のものに，検体の0.5gずつを1週1回，右耳介内側面に広く可及的均等に塗布し，2カ月に亘り，局所及び全身の症状，健康状態等を観察し，実験2と同様検体塗布前に毎回採血し，血液は色素の検出にあてた．

抽　出　法

実験2と同様に行なつたがローダミン6GCPの回収率はローダミンBに比べやや不良であつた．また展開剤[2]はアルコール：アンモニア水：水（3：8：13）を用いた．本抽出法によるとローダミン6GCPは血液5cc中約0.5γまで検出可能である．

実　験　7.　ローダミンB及び6GCP水溶液の経皮投与実験

体重2.47～3.00kgの雄性ウサギ6匹を3匹ずつの2群に分け腹部皮膚を5×8cm位電気バリカンで剪毛し傷のないことを確かめたのち，背位に固定し5×7cm内径のパラフィン枠を周囲の毛と共に腹壁上に固定し0.5gの脱脂綿を枠内にほぼ均等に敷きつめ，ローダミンB及び6GCP飽和水溶液（1%溶液）をそれぞれ10ccずつを，こ

の脱脂綿上に注ぎ，色素液の池を作り，6時間放置し，色素液と腹壁皮膚とを接触させ，その後枠を外し，温湯で腹壁を洗滌清拭し，その後代謝箱にいれ24時間尿量を5～7日に亘り測定し，その一部を色素の検出にあてた．

実験結果

実験 1． ローダミンBの経口急性毒性試験

(1) マウスを用いた実験

ローダミンB経口投与マウスは，100mg/kg群では30～40分後に，150mg以上の群では15～20分後に耳翼四肢尾及び腹部その他の皮膚が淡桃色となり，次いで運動が漸次緩慢となる．400mg/kg以上の群では，体温の下降が著明で2時間後頃より急激に間代性乃至は強直性痙攣を現わすようになる．この痙攣発作は1～2分で緩解するが，数分後に再発し，漸次発作間隔が少なくなりついには呼吸麻痺の下に斃れる．

症状発現時間は，検体投与量の増加とともに短縮するが，致死時間は区々で，200mg/kgで108分で死亡したものがあるに拘らず，700mg/kg群のうち5匹は，109分以上24時間以内に死亡した．

各群マウスの死亡率は表1に示したが体重1kg当り300mg以上900mgまでの間では，なかには死亡することなく，その後恢復する例も見られるので，死亡例の消化管内に投与検体の相当量が残存している点からみても，ローダミンBの吸収またはその他分解解毒等の機序において相当な個体差があるのではないかとも考えられる．

表 1　ローダミンB経口投与急性毒性試験におけるマウス死亡率

投与量 (mg/kg)	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500	550	600	700	800	900	1000	1100
死亡率			0/6	0/6	5/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6						
						3/6	3/6	0/6	2/6	4/6	6/6	6/6	5/6	6/6	5/6	6/6	6/6
	0/6	1/6	1/6	1/6	4/6	6/6	6/6	6/6	6/6	5/6	5/6						

死亡例の各臓器組織は濃桃色に著色しその本来の色調は判定困難でその他肉眼触手による検査では異常は認められなかつた．

(2) ラットを用いた実験

(i) ラットにおける経口投与時の急性中毒症状はマウスと同様で，症状は検体500mg/kg以上の投与群に認められ，皮膚，屎，尿の着色，間代性並びに強直性痙攣，体温下降等が現われて呼吸停止して死亡した．死亡率は表2に示したが，この場合もマウスと同様に用量に比例して死亡率が増加し且つ致死時間が短縮するという傾向は全く認められなかつた．すなわち，900～1,000mg/kgの死亡例はすべて6～18時間以内に死亡したに拘らず500～700mg/kg群のうちには285分乃至415分で死亡したものもみられた．

表 2　ローダミンB経口投与急性毒性試験におけるラット死亡率

投与量 (mg/kg)	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000	1100	1300	1500
死亡率	0/5	0/5	2/5	1/5	3/5	3/5	3/5	1/5	1/5	3/5	3/5	4/5	1/5

したがつてこの場合も，マウスを用いた試験と同様今回の用量範囲からは致死量を求め得なかつた．

(ii) ローダミンB100～500mg/kg 1回経口投与ラットでは500mg/kg群の2匹は急性中毒症状を現わして死亡したが，24時間後には，残りの各ラットは恢復し，その後1週間に亘り異常を示さず，体重も増加傾向を示した．1週間後に殺戮し肉眼触手により主要臓器を検査したが，各臓器桃色に着色している外特に異常を認めなかつた．また，主要臓器重量は，表3に示したが，このうち，300mg/kg群のみが対100g体重の臓器重量が他群に比してやや大きい値を示しているのは，この群の殺戮時体重がやや少なかつたことによるもので，各群に大きな差は認められなかつた．

表 3 ローダミンB経口投与急性毒性試験におけるラットの各臓器重量

投与量 (mg/kg)	体重	肝臓	脾臓	腎臓		心臓
				左	右	
100	219.0	9.05 / 4.13	1.00 / 0.46	1.00 / 0.46	1.00 / 0.46	0.90 / 0.41
200	244.5	9.65 / 3.93	0.95 / 0.39	1.15 / 0.47	1.05 / 0.43	1.05 / 0.43
300	205.0	8.60 / 4.19	2.55 / 1.24	1.10 / 0.54	1.10 / 0.54	1.02 / 0.50
400	239.0	9.85 / 4.03	0.98 / 0.40	1.15 / 0.48	1.15 / 0.48	1.05 / 0.44
500 *	241.0	9.00 / 3.71	1.05 / 0.45	1.00 / 0.41	1.00 / 0.41	0.90 / 0.37
	193.0	8.05 / 4.18	0.38 / 0.20	0.80 / 0.42	0.83 / 0.43	0.80 / 0.42

註 : 表中数値のうち，斜線上部は原重量を下部はg/100g体重を示す.

* 印は投与当日死亡の2例平均値を示す.

実 験 2. ローダミンBの経皮投与実験

ローダミンB水溶液の経皮投与を行ない，さらに毎週1回 15cc ずつ心臓より採血した各群ウサギ体重は，表4に示したように減少傾向を辿ることなく，飽和液及び飽和 10倍液群の各1例がそれぞれ 25日及び10日に死亡したが，これは心臓より採血時に死亡したもので，全期間を通じて喫食，運動状態共に良好で中毒症状も全く現われなかつたので，検体投与がウサギの生育にとくに影響を及ぼすとは考えられない．検出実験の結果は表5に示した.

表 4 ローダーミン B (飽和溶液0.5cc/日) 連続塗布試験兎体重表

	No. \ 日数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
飽和液	1	1.75	1.77	1.76	1.82	1.76	1.78	1.83	1.77	1.74	1.80	1.83	1.78	1.90	1.85
	2	1.76	1.79	1.78	1.73	1.75	1.65	1.65	1.65	1.65	1.69	1.64	1.63	1.68	1.70
	3	1.61	1.70	1.57	1.67	1.78	1.74	1.80	1.78	1.77	1.74	1.80	1.72	1.81	1.81
平均		1.71	1.75	1.70	1.74	1.76	1.72	1.76	1.73	1.72	1.74	1.76	1.71	1.80	1.79
増加量		−	0.04	0.01	0.03	0.05	0.01	0.05	0.02	0.01	0.03	0.05	0	0.09	0.08
飽和10×稀釈液	1	1.86	1.95	1.93	1.93	1.95	1.95	1.92	1.88	1.73	1.77	1.80	1.74	1.71	1.76
	2	1.67	1.83	1.81	1.77	1.81	1.84	1.80	1.75	1.76	1.80	1.84	1.85	1.87	1.86
	3	1.89	1.97	1.97	2.00	2.02	1.99	1.90	1.92	2.03	2.05	+			
平均		1.81	1.92	1.90	1.90	1.93	1.93	1.87	1.85	1.84	1.87	1.82	1.80	1.79	1.81
増加量			0.11	0.09	0.09	0.12	0.12	0.06	0.04	0.03	0.06	0.01	−0.01	-0.02	0
飽和100×稀釈液	1	1.64	1.74	1.70	1.71	1.75	1.67	1.70	1.73	1.72	1.60	1.77	1.74	1.80	1.79
	2	1.70	1.60	1.60	1.60	1.51	1.50	1.55	1.59	1.60	1.60	1.57	1.57	1.55	1.55
	3	1.62	1.75	1.68	1.67	1.52	1.72	1.74	1.68	1.73	1.74	1.73	1.76	1.80	1.82
平均		1.65	1.70	1.66	1.66	1.59	1.63	1.66	1.67	1.68	1.65	1.69	1.69	1.72	1.72
増加量			0.05	0.01	0.01	−0.06	−0.02	0.01	0.02	0.03	0	0.04	0.04	0.07	0.07
対照	1	1.73	1.56	1.72	1.82	1.83	1.80	1.86	1.87	1.82	1.65	1.63	1.70	1.68	1.81
	2	1.79	1.81	1.77	1.81	1.80	1.87	1.94	1.97	1.95	1.95	1.95	1.94	1.96	1.95
	3	1.77	1.87	1.78	1.76	1.79	1.86	1.93	1.90	1.87	1.86	1.88	1.90	1.95	2.00
平均		1.76	1.75	1.76	1.80	1.81	1.84	1.91	1.91	1.88	1.82	1.82	1.85	1.86	1.92
増加量			−0.01	0	0.04	0.05	0.08	0.15	0.15	0.12	0.06	0.06	0.09	0.10	0.16

註 : 枠内数値はkgを表わす.

	日数 / No.	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
飽和液	1	1.87	1.86	1.78	1.80	1.86	1.88	1.82	1.93	1.92	1.93	1.95	1.98	2.00	1.92
	2	1.74	1.69	1.69	1.72	1.73	1.72	1.72	1.74	1.75	1.74	1.73	+		
	3	1.85	1.86	1.83	1.88	1.90	1.91	1.95	1.96	1.94	1.93	1.98	1.95	1.87	1.78
平　均		1.82	1.80	1.77	1.80	1.83	1.84	1.83	1.88	1.87	1.87	1.89	1.97	1.94	1.85
増加量		0.11	0.09	0.06	0.09	0.12	0.13	0.12	0.17	0.16	0.16	0.18	0.26	0.23	0.14
飽和 10× 稀釈液	1	1.77	1.85	1.83	1.81	1.88	1.95	1.76	1.85	1.88	1.87	1.90	1.90	1.92	1.91
	2	1.80	1.82	1.83	1.85	1.81	1.87	1.83	1.87	1.88	1.80	1.87	1.94	1.82	1.89
	3														
平　均		1.79	1.84	1.83	1.83	1.85	1.91	1.80	1.86	1.88	1.84	1.86	1.92	1.87	1.90
増加量		−0.02	0.03	0.02	0.02	0.04	0.10	−0.01	0.05	0.07	0.03	0.05	0.11	0.06	0.09
飽和 100× 稀釈液	1	1.82	1.80	1.78	1.79	1.86	1.86	1.89	1.90	1.95	1.84	1.90	1.94	1.91	1.98
	2	1.64	1.60	1.64	1.59	1.61	1.71	1.68	1.68	1.65	1.71	1.79	1.65	1.85	1.85
	3	1.82	1.80	1.80	1.83	1.80	1.71	1.77	1.79	1.80	1.81	1.84	1.77	1.85	1.87
平　均		1.76	1.73	1.74	1.74	1.76	1.76	1.98	1.79	1.80	1.79	1.84	1.79	1.87	1.90
増加量		0.11	0.08	0.09	0.09	0.11	0.11	0.13	0.14	1.15	0.14	0.19	0.14	0.22	0.25
対照	1	1.83	1.84	1.90	1.86	1.94	1.95	1.95	1.94	1.98	1.96	1.96	2.10	2.11	2.12
	2	2.01	2.02	2.01	2.12	2.09	2.10	2.12	2.18	2.15	2.15	2.05	2.07	1.98	1.72
	3	2.01	1.98	1.93	1.98	2.01	2.02	2.08	2.19	1.97	1.99	2.10	2.10	2.12	2.15
平　均		1.95	1.95	1.95	1.99	2.01	2.02	2.05	2.10	2.03	2.03	2.04	2.09	2.07	2.00
増加量		0.19	0.19	0.19	0.23	0.25	0.26	0.29	0.34	0.27	0.27	0.28	0.33	0.31	0.24

表5の1　ローダミンB飽和水溶液塗布実験

	ローダミンB塗布血液			対照血液		
No.	No. 1	No. 2	No. 3	C_1	C_2	C_3
7日後	+	+	+	−	−	−
14日後	−	−	−	−	−	−

表5の2　ローダミンB飽和水溶液塗布実験

	ローダミンB塗布血液			対照血液		
No.	R_1	R_2	R_3	C_1	C_2	C_3
7日後	+	+	+	−	−	−
14日後	−	−	±	−	−	−
21日後	−	−	−	−	−	−
28日後	−	−	−	−	−	−

表5の3　飽和水溶液の10倍及び100倍稀釈液塗布実験

No.	No. 10倍稀釈液塗布血液		100倍稀釈液塗布血液		
	B_1	B_2	C_1	C_2	C_3
塗布前	—	—	／	／	／
7日後	—	—	±	±	±
14日後	±	±	—	—	—
21日後	—	—	—	—	—
28日後	—	—	—	—	—

対照血液より得た抽出残留物は淡黄褐色を呈し，これをアルコールに溶かし沪紙に点じると淡黄褐色のスポットを形成し，紫外線（3650Å）を照射すると暗褐色を呈し，その周辺部に青白色の螢光がある輪帯が認められるのみであつたが，ローダミンB塗布血液（表5の1及び…3）7日後採取のものより得たスポットはその中央部が淡黄褐色を呈し，周辺部に赤色の輪帯が認められた．この赤色の輪帯は紫外線照射により赤橙色の螢光があつた．これを展開すると，（展開距離約20cm，室温）対照血液より得たものは原点に淡黄褐色のスポットと溶媒前線近くに淡黄色のスポットを認め，紫外線照射によつて原点のものは螢光がなかつたが，上部のスポットは青白色の螢光があつた．しかるに塗布血液7日後採取のものは青白色の螢光があるスポットのやや下方に赤橙色の螢光がある赤色のスポット（Rf0.60）が認められた．よつてローダミンBと比較実験を行なつたところ，Rf，色相，螢光等ローダミンBのそれと全く同じであつた．14日，21日及び28日後に採取した血液は14日後のものにローダミンBの存在を疑わしめる1例を認めたがそれ以外はすべて陰性であつた．飽和水溶液の10倍稀釈液及び100倍稀釈液塗布血液については7日後（100倍稀釈液塗布）及び14日後（10倍稀釈液塗布）に疑わしい2例があつたが，その他は陰性であつた．また飽和水溶液塗布7日後の血液5cc中のローダミンBの量は沪紙クロマトグラムについてローダミンB標準液のそれと比較して概測した結果約0.2γであつた．

実験 3.　オレンジⅡの急性毒性試験

各群マウス共注射後15〜40分位で皮膚は橙色となり運動減少するが検体2.0g/kg以上の群では，10〜20分後頃から震顫を認めるものがあり反射亢進し，呼吸も促迫する．更に症状が進めば間代性続いて強直性痙攣に陥り，30秒位で緩解するが，この痙攣発作を反復し呼吸停止し次いで心搏動も止る．中毒症状の発現と致死時間は必ずしも検体注射量増加と逆比例して著しくなり且つ短縮する傾向はなかつた．致死時間は2〜24時間以内でその後は恢復し1週間観察してもその間に死亡例なく，したがつて24時間後の死亡率（表6参照）より50％致死量を求めると，2.10g/kgで，その上下限はそれぞれ2.22及び1.99g/kgであつた．

表6　オレンジⅡ皮下注射マウスの死亡率（24時間）

注射量 (g/kg)	1.25	1.50	1.75	2.00	2.25	2.50	2.75	3.00	3.50
死亡率	0/6	1/6	1/6	3/6	3/6	5/6	5/6	5/6	6/6

また剖検例は，血液の凝固がやや阻害され，臓器組織は橙色に着色したが肉眼的に著変はなかつた．

実験 4.　ローダミンB及びオレンジⅡの経皮投与実験

実験開始10日後頃までは，両群ウサギの体重増減は不定であつたがその後両群とも同様に良好な体重増加傾向をとり，3カ月後殺䠶時には，それぞれの体重平均値は，ローダミンB・ステアレート群2.10kg，オレンジⅡアルミニウムレーキ群2.23kgで大差はなかつた．また，中毒症状，局所の変化等も何等認められなかつたが，ローダミンB群の1匹は，76日後に採血後の胸腔内溢血で死亡した．

検出実験の結果は表7に示した．

表7の1　ローダミンBステアレート経皮投与ウサギ血液よりの色素の検出結果

経過（週）	動物番号				
	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5*
1	−	±	−	±	−
2	−	−	−	−	−
4	±	−	±	−	−
5	/	−	/	−	−
6	/	−	/	−	−
7	/	−	/	−	−
8	/	−	/	−	−
9	/	−	/	−	−
10	/	−	/	−	−
11	/	−	/	−	/
12	/	−	/	−	/

註：斜線は剖検のため殺す．

表7の2　オレンジⅡアルミニウムレーキ経皮投与ウサギ血液よりの色素検出結果

経過（週）	動物番号				
	O_1	O_2	O_3	O_4	O_5
1	−	−	−	−	−
2	−	−	−	−	−
4	−	−	−	−	−
5	/	−	−	/	−
6	/	−	−	/	−
7	/	−	−	/	−
8	/	−	−	/	−
9	/	−	−	/	−
10	/	−	−	/	−
11	/	−	−	/	−
12	/	−	−	/	−

註：斜線は剖検のため殺す．

ローダミンBステアレートより製した口紅の塗布実験においては表7の1に示したとおり，実験群R_1，R_3の第4週及び実験群R_2，R_4の第1週に採取した血液中にローダミンBの存在を疑わしめる反応を認めた以外はすべてローダミンBを検出しなかつた．さらに実験群R_2，R_4（塗布第12週後）から採取した尿及び糞便について色素の検出実験を行つたところ尿よりは検出できなかつたが，実験群R_2，R_4の糞便中より微量のローダミンBを検出した．

オレンジⅡのAlレーキより製した口紅の塗布実験の結果は表7の2に示したとおり全回を通じてオレンジⅡを検出しなかつた．

実　験　5.　ローダミン6GCPの急性毒性試験

中毒症状の発現は，検体投与量の増加に伴ない激烈となり，その発現時間も速やかになつた．検体投与後，各群マウスは運動減少するが350mg/kg以上の群では3時間後頃から歩行蹣跚，腹這いとなり，呼吸の抑制及び体温の降下の下に麻痺性症状を現わし斃れるものが多かつた．しかし，400mg/kg群の1例は3時間後に強直性痙攣を起し，後強反射して死亡し，150mg/kgの1例も5時間後に震顫と軽度の間代性痙攣を来して斃れた．48時間以後には，生存例はほとんど恢復した．死亡率は表8に示したが，24時間後の死亡率から50%致死量を求めると

その値は195.1mg/kgで，その上，下両限はそれぞれ226.1及び167.0mg/kgとなつた．

表 8　ローダミン6GCP経口投与マウスの死亡率

投与量(mg/kg) ＼ 経過時間	1	2	3	4	5	6	24	48	72	96	120	144	168
50	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
100	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	1/6	1/6	1/6	1/6	1/6	1/6	1/6
150	0/6	0/6	1/6	1/6	2/6	2/6	3/6	3/6	3/6	3/6	3/6	3/6	3/6
200	0/6	2/6	2/6	2/6	3/6	3/6	3/6	3/6	3/6	3/6	3/6	3/6	3/6
250	0/6	1/6	1/6	1/6	1/6	1/6	2/6	2/6	2/6	2/6	2/6	2/6	2/6
300	0/6	0/6	1/6	2/6	3/6	3/6	5/6	5/6	5/6	5/6	5/6	5/6	5/6
350	0/6	0/6	2/6	3/6	3/6	3/6	3/6	3/6	3/6	3/6	3/6	3/6	3/6
400	1/6	2/6	3/6	5/6	5/6	5/6	5/6	5/6	5/6	5/6	5/6	5/6	5/6
450	0/6	0/6	4/6	4/6	4/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6

実 験 6． ローダミンB及び6GCPAl及びBaレーキ経皮投与実験

検体投与後も被検群ウサギの喫食，運動状態は良好で，体重の増加も対照よりむしろ良好であつた．(表9参照) しかし，ローダミン6GCP群の1例は36日後に体重減少して死亡し，肋膜の癒着と腔滲出液のちよ留肝臓に小膿瘍及び腎臓に梗塞性病巣を認めた．また対照群の1例は42日後採血時に死亡した外，検体投与によると思われる死亡または異常症状を現わした例はなかつた．その他の例もそれぞれ2週間及び2ヵ月後に解剖したが，肉眼的に，主要臓器及び局所に異常を認めていないので，検体投与によりウサギの生育及び健康状態に著明な影響を与えるとは考えられない．主要臓器重量についても表10に示したようにいくらかの個体差はあるが，対照に比し，被検群が特に異常な傾向を示すことは観察されなかつた．

色素の検出実験の結果は表11に示した．

表 9　ローダミンB及びローダミン6GCP塗布家兎の体重表

経過日数		0°	3	7°	10	14°	17	21°	24	28°	31	35°	38	42°	45	49°	52	56°	59
ローダミンB塗布群	1	2.39	2.50	2.60	2.58	2.21*													
	2	2.75	2.80	2.90	2.92	2.97	2.95	2.85	2.97	2.89	2.37	2.78	2.77	2.74	2.78	2.83	2.73	2.87	2.72*
	3	2.24	2.63	2.47	2.96	3.15	3.07	3.20	3.07	3.31	3.02	3.15	3.15	3.15	3.15	3.20	3.20	3.31	3.35*
	4	2.54	2.54	2.95	2.45	2.38	2.45	2.53	2.44	2.35*									
ローダミン6GCP塗布群	1	2.65	2.35	2.48	2.33	2.40	2.41	2.40	2.25	2.65	2.53	2.48	2.30	36日目に死亡					
	2	2.75	2.54	2.83	2.84	2.85	2.70	20日目に死亡											
	3	2.24	2.54	2.73	2.71	2.84	2.83	2.80	2.75	2.89	2.87	2.73	2.71	2.80	3.00	3.00	3.15	3.32	3.31*
	4	2.54	2.32	2.43	2.50	2.45*													
対照群	1	2.31	2.14	2.85	1.98	2.20*													
	2	2.64	2.60	2.20	2.58	2.66	2.54	2.18	2.31	2.30*									
	3	2.50	2.54	2.66	2.80	2.90	2.91	2.94	2.81	3.10	3.20	3.06	3.10	3.13	42日目に死亡				
	4	2.24	2.22	2.24	2.21	2.35	2.34	2.32	2.29	2.38	2.85	2.34	2.36	2.36	2.39	2.55	2.70	2.64	2.78*

註：＊印　解剖　　○印　採血

表 10　ローダミンB及びローダミン6GCP塗布家兎の臓器重量表

	No.	体重	肝臓	脾臓	心臓	腎臓 左	腎臓 右	肺臓 左	肺臓 右
ローダミンB塗布群	1	2.21	69.5／31.4	1.3／0.59	5.6／2.53	6.1／2.71	6.0／2.71	3.9／1.76	6.4／2.90
	2	2.72	59.5／21.8	1.5／0.55	7.2／2.65	6.4／2.35	7.0／2.57	4.2／1.54	6.1／2.24
	3	3.35	95.0／28.4	3.0／0.90	13.0／3.80	8.1／2.42	8.1／2.42	5.2／1.55	7.8／2.33
	4	2.35	98.0／41.7	1.5／0.65	6.7／2.85	8.9／3.79	8.7／3.70	4.0／1.70	5.5／2.34
ローダミン6GCP塗布群	1	2.32	96.5／41.6	4.9／2.11	11.0／4.76	7.6／3.28	9.1／3.92	6.5／2.80	8.8／3.79
	2	2.70	73.7／27.3	1.1／0.41	8.4／3.11	10.2／3.78	10.0／3.70	4.7／1.74	8.0／2.96
	3	3.31	82.0／24.8	1.8／0.54	10.7／3.23	7.8／2.36	8.2／2.48	7.4／2.24	10.9／3.29
	4	2.45	63.9／26.1	2.0／0.82	6.2／2.53	7.9／3.22	7.8／3.21	3.4／1.39	5.5／2.24
対照群	1	2.20	57.9／26.3	1.3／0.59	5.3／2.41	6.2／2.82	5.8／2.64	3.7／1.68	5.7／2.63
	2	2.30	57.2／24.9	1.3／0.57	6.0／2.60	5.4／2.34	5.2／2.26	3.8／1.65	6.3／2.74
	3	3.13	123.0／39.3	2.7／0.86	9.2／2.94	9.6／3.07	9.4／3.00	8.5／2.72	12.6／4.03
	4	2.78	65.6／23.6	1.5／0.54	8.8／3.17	6.5／2.34	6.4／2.30	4.5／1.62	8.2／2.95

註：表中数値のうち斜線上部は原重量，下部は対1kg体重を示す．

表 11　ローダミンB及び6GCP Al，Baレーキ経皮投与ウサギ血液よりの色素の検出

No. ＼ 経過(日)	ローダミンB塗布血液 1	2	3	4	ローダミン6GCP塗布血液 1	2	3	4	対照血液 1	2	3	4
0	—	—	—	—	—	—	—	—			—	—
5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
12	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
19	｜	—	—	—	—	｜	—	｜	｜	—	—	—
26	解剖	—	—	—	—	｜	—	｜	｜	—	—	—
33	｜	—	—	｜	—	死亡	—	解剖	解剖	｜		—
40	｜	—	—	解剖	死亡	｜	—	｜	｜	解剖	｜	—
54	｜	—	—	｜	｜	｜	—	｜	｜	｜	死亡	—

註：空欄は採血しないもの．

ローダミンB及び6GCPより製した口紅の塗布実験の結果は全期間を通じて血液からこれらの色素を検出しなかつた．なお塗布後12日，26日及び58日目の家兎を解剖し，肺，心，腎，肝及び脾の各臓器について色素の検出を試みたがいずれも色素の反応は陰性であつた．

実　験 7.　ローダミンB及び6GCP水飽和液経皮投与実験

実験結果は表12に示したが，実験期間中各ウサギは異常なく，体重も減少傾向を取るようなことはなかつた．色素検出実験は実験2と同様に行なつた．（ただし試料として尿10ccを用いた．）実験結果を表12の1，12の2に示した．

表12の1　ローダミンB飽和水溶液経皮投与ウサギ尿中色素の検出

No.	1				2				3			
経過日数	体重 (kg)	尿量 (cc)	尿中ローダミンB 検出結果10cc中含有量	尿中ローダミンB 尿の色	体重 (kg)	尿量 (cc)	尿中ローダミンB量 10cc中含有量	尿中ローダミンB量 尿の色	体重 (kg)	尿量 (cc)	尿中ローダミンB量 10cc中含有量	尿中ローダミンB量 尿の色
	3.00	190			2.55	160			2.60	165		
検体塗布	2.95	140	(－)	淡褐黄色	2.55	131	(－)	淡褐黄色	2.55	135	(－)	淡褐黄色
1	2.90	60	(＋)	淡橙色	2.60	65	(＋)	淡橙黄色	2.60	215	(＋)	淡橙色
2	2.90	115	(＋)	淡橙黄色	2.60	130	(＋)	淡橙黄色	2.60	165	(＋)	淡橙色
3	3.05	190	(＋)	淡褐黄色	2.65	180	(＋)	淡橙黄色	2.60	125	(＋)	淡橙黄色
4	3.00	120	(＋)	淡褐黄色	2.55	150	(＋)	淡褐黄色	2.60	100	(＋)	淡褐黄色
5	3.10	75	(±)	淡褐黄色	2.50	120	(±)	淡褐黄色	2.65	40	(＋)	淡褐黄色
6	3.05	170	(－)	淡褐黄色	2.50	175	(－)	淡褐黄色	2.65	160	(＋)	淡褐黄色
7	3.05	115	(－)	淡褐黄色	2.50	50	(－)	淡褐黄色	2.65	135	(－)	淡褐黄色

表12の2　ローダミン6GCP飽和水溶液経皮投与ウサギ尿中色素の検出

No.	1				2				3			
経過日数	体重 (kg)	尿量 (cc)	尿中ローダミン6GCP 検出結果	尿中ローダミン6GCP 尿の色	体重 (kg)	尿量 (cc)	尿中ローダミン6GCP量 10cc中含有量	尿中ローダミン6GCP量 尿の色	体重 (kg)	尿量 (cc)	尿中ローダミン6GCP量 10cc中含有量	尿中ローダミン6GCP量 尿の色
	2.48	240			2.58	200			2.47	195		
検体塗布	2.53	123	(－)	淡褐黄色	2.58	55	(－)	淡褐黄色	2.48	190	(－)	淡褐黄色
1	2.43	105	(－)	淡褐色	2.53	110	(＋)	淡褐黄色	2.48	110	(－)	淡褐黄色
2	2.48	85	(－)	淡褐黄色	2.58	90	(－)	淡黄褐色	2.50	65	(－)	淡褐黄色
3	2.48	135	(－)	淡褐黄色	2.54	165	(－)	淡黄褐色	2.53	145	(－)	淡褐黄色
4	2.52	235	(－)	淡褐黄色	2.54	170	(－)	淡褐黄色	2.53	175	(－)	淡褐黄色
5	2.55	80	(－)	淡褐黄色	2.56	95	(－)	淡褐黄色	2.54	105	(－)	淡褐黄色

Rhodamine B 飽和水溶液の場合は塗布後24時間内に排泄された尿中に最も強くあらわれ時間の経過とともに減少してゆく様に観察された．尿より抽出された色素溶液を濃縮しアルコール：アンモニア水：水（3.0：8.0：13.0）で展開するとRhodamine B（Rf 0.60）の下方に淡橙色スポット（Rf 0.51）が認められ更に下方に（Rf 0.36)淡黄色スポットが認められた．このスポットに紫外線（3650Å）を照射すると淡橙色スポットは帯橙黄色螢光があり淡黄色スポットは青白色の螢光があつた．この現象は Rhodamine B を塗布した家兎より排泄された尿より前記抽出操作を行い得た抽出液についてのみみとめられ，対照として塗布前の尿を同様処理した場合にはみとめられなかつた．

このクロマトグラムよりRhodamine B は体内に吸収されるとある種の変化をうけ他の物質に若干変化して排泄されるのではないかと思われた．この物質はRhodamine Bと平行して減少してゆく様である．

Rhodamine 6GCP 飽和水溶液の場合は個体差はあるが塗布後24時間内に排泄された尿中より微量橙赤色物質がみとめられた．この色素をアルコール：アンモニア水：水（3：8.0：13.0）にて展開すると Rf 約0.41）に紫外線照射により帯橙色螢光を有するスポットがみとめられ．更に下方（Rf 約0.21）に青白色螢光を有するスポット

がみとめられた．Rhodamine 6GCP (Rf 0.09)に近いスポットは紫外線照射によりかろうじてみとめられるに過ぎず，Rhodamine 6GCP として排地されるよりも一部体内に吸収された色素は Rhodamine B の場合と同様ある種の変化をうけ他の物質に変化して排泄されるのではないかと思われた．またRhodamine 6GCPはRhodamine Bよりもその検出量ははるかに微量であつた．

考　　　察

ローダミンBの急性毒性試験において，今回のマウス及びラットの経口投与試験によつては50% 致死量推定値を求め得なかつたが，小田[3]等の報告によると，LD50はマウス及びラットでそれぞれ170mg/kg 及び 246mg/kgであるという．われわれが反復実験を行なつた結果からはこの LD50 近くで実験動物の約半数が死亡することも認めたがさらに大量の投与に耐えて生き残る例も多く，色素の生体内運命とともに今後追求すべき問題であろう．

ローダミンB経皮吸収に関しては，青木[4] の報告によつてほぼ明らかで，われわれも，その追試により尿中に24時間以内に相当量が排泄されることを確認し，クロマト紙上の紫外線照射により，一部が変化した形で尿中に排泄されることも明らかにした．同時に経皮投与後血液からもその分離に成功し，ローダミンBの経皮吸収の可能なことを知つた．またこの色素を各種レーキとして口紅基材に混じた場合には，水溶液よりもやや吸収が悪くなるものと考えられる結果を得た．すなわち，飽和水溶液と Al, Ba レーキとの両種の投与実験において動物に毎回投与された色素量はほぼ同量であるに拘らず後者では血液から検出し得なかつた．またステアリン酸レーキとした場合に血液から検出し得たが，このときの濃度は上記両実験よりはるかに大であるので，レーキの形の変化と経皮吸収の差は，未だ明らかではないが濃度（投与量）と正比例して経皮吸収が増大することは充分考えられる．

ローダミン 6GCP についても同様なことが云えるが，尿からの検出実験により，その経皮吸収の可能なことを知つた．

ただオレンジⅡのみは，消化管からの吸収は充分考えられるが，その経皮吸収を確認する結果は得られなかつた．

各実験における動物の主要臓器の病理組織所見及び色素投与の性週期に及ぼす影響については，別に報告の予定である．

総　　　括

ローダミンB，6GCP 及びオレンジⅡの 3 種色素につき，マウスまたはラットを用い検体を経口投与し急性毒性試験を行ない次の結果を得た．

ローダミンBではマウス，ラット共に LD50 を求め得ず，従来の報告よりも遥かに高い値が考えられそれぞれ900mg/kg以上でも生存例を認めた．

オレンジⅡのマウスに対する LD50 は2.10 (2.22～1.99) g/kgで，ローダミン6GCPでは 195.1 (226.1～167.0) mg/kgとなつた．

これら検体の経口投与をうけた動物は，先ず皮膚に色素吸収後の着色を認めた後運動減少し，間代性乃至強直性痙攣を起して死亡したが主要臓器の肉眼触手による検査では，とくに異常を認めなかつた．

ローダミンBの経皮吸収は，血液及び尿よりの検出により確認されたが，レーキとして口紅基材に混ぜるときは，水溶液の形で投与する場合よりも吸収され難いと考えられる結果を得た．ローダミン 6GCP についても同様なことを認めたが，オレンジⅡの経皮吸収については．その可能性を明らかにし得なかつた．

本研究は厚生科学研究費の補助を受けた．また終始御指導をうけた刈米達夫所長に感謝いたします．

文　　　献

1) Dolinsky, M : J Assoc. official agr. Chemists, 32, 130 (1949)
2) 藤井：本誌，73，335 (1955)
3) 小田：日医大誌，23，157 (1956).
4) 青木：京府医大誌，19，559 (1937).

Summary

Aniline dyes, such as rhodamine B, rhodamine 6GCP and Orange 2 were administered orally to mice and rats and acute toxciity test was performed.

Results were as follows :

1. Rhodamine B administered to rats and mice caused tonic and clonic convulsion, but their mortality was not always paralleled with dosage increase, so LD50 could not calculated in thls experiment.

   LD50 of rhodamine 6GCP was 2.10 g per kilogram and of Orange 2 was 195.1 mg per kilogram. Mice in these experiments showed convulsilon described above and died of respiratory paralysis.

2. Dermally administered rhodamine 6GCP and rhodamine B were detected in blood and in urine of rabbits with some of their metabolites, and rhodamine administered as aqueous solution seemed to be absorbed much easier than administered as lake in some cold cream or lip stick base.

   Orange 2 administered as above could not recovered from the blood of rabbits.

Received June 18, 1956

原水爆実験による放射能汚染の研究（第7報*）
魚類の放射能汚染とその放射化学分析

長沢佳熊，中山豪一，榎本正義，
亀谷勝昭，城戸靖雅

Studies on Radio-Contamination of Foodstuffs Effected by A-or H-Bomb Explosion. VII.
Radio-Contamination of Sea Fish and Its Radio-Chemical Analysis.

Kakuma NAGASAWA, Goichi NAKAYAMA, Masayoshi ENOMOTO,
Katsuaki KAMETANI and Yasumasa KIDO.

1954年ビキニ環礁における原水爆実験によつて生じた放射性物質によつて，南方海域の海水や魚獲物が著しい汚染を受けた．厚生省では，南太平洋から入港する漁船の魚獲物について放射能検査を行うことを指令した．当時，その汚染の著しいと認められた魚類については廃棄処分を行なつた．同年12月その汚染の大部分は ^{65}Zn から成り，放射性 Sr の含量はきわめて少量であることが著者等の分析によつて明らかとなつたので[1] この汚染は最大許容量以下であるとの見地から，魚類の検査を打切り今日に至つた，その後1956年再び原水爆実験が行われるに当り，魚類汚染に及ぼす影響調査の目的で，ビタミン油の原料として我が国で入取の可能なマグロ，カジキ類の肝臓について，放射能調査と，放射性 Sr の分析を行つた．

南太平洋から漁船が東京築地魚市場に持ち帰るマグロ類，カジキ類の肝臓の放射能汚染を調査した．結果を Table 3 に示す．結論としては，(a) 1956 年度の水爆実験開始以前のものでもかなりの放射能汚染を示したものがある．これは当然1954年に行われた水爆実験による汚染であると断言してよい．(b) その後の調査で，今回の水爆実験で著しく肝臓中の放射能量が増加したという成績は認められない．(c) 1954 年度の汚染に比してその程度は著しく弱い．これは検体の採取方法によるものであるかもしれない．すなわち，1954 年度における検体は，大規模な魚類の検査を行なつていたので，魚体表面から著しく放射能を検出した魚のみを特に選んで調査した成績であり，今回の検体は，魚体の放射能汚染の有無に関係なく選びだした成績であることによるかもしれない．また以下は我々の推測の域をでないかもしれないが，1954 年度の水爆は環礁の一部を吹きとばすほどの大きな爆発を伴い，魚類に対する汚染も甚だしかつたのであろうか．それに対して1956 年度のものは主として空中における爆発であつたため，海中の汚染が少なかつたとも考えられよう．

入取した検体中特に高カウントを示すものについて，Harley[2] による沈澱法及び Tomskins によるイオン交換法[3] によつて ^{90}Sr の分析を試みた．しかし，いずれの場合にも Sr の部分には放射能を認め得なかつたが，この実験と並行して，同一条件下に行つたアイソトープを用いてのモデル実験により，これらの方法によつては Sr を完全に定量的に回収することが困難であり，従つて微量の ^{90}Sr の分析には不適当であると認め，Sr の定量法を確立した上で更に検体につき検討すべく，目下定量法について研究中である．

終りに検体採取の労をとられた東京都市場衛生検査所の諸氏に感謝する．

実験の部

放射能測定条件：科学研究所製 32 進型 Scaler，マイカ窓 2.3mg/cm² 効率 21.54～21.66%（National Bureau of Standards, RaDE：No. 2611, 197dis./sec. July 1, 1954 を標準とした．）

測定方法：生腺（全）：記載重量の検体を径 8 cmのビーカになるべく均等に拡げ，距離約 2 cm で 10～30 分間測定した．

---

* 第6報：本誌74号，231頁（1956）

生腺：検体1gを試料皿に拡げ，10～30分間測定した．

乾燥物：生腺をペトリ皿に拡げ，水浴上で乾燥，粉砕後，その1gを試料皿にとり，10～30分間測定した．

灰分：No. 1～No. 21までは5g，No. 22以下は3gの乾燥物を硫硝酸を用いて灰化，灰分を試料皿に移し，10～30分間測定した．

実験1.　沈澱法による^{90}Sr＋^{89}Srの分析

灰分0.4711g（検体No. 31）を濃硝酸1ccに溶かし，不溶物を遠心分離し，これを水約1ccずつで4回洗い，洗液は硝酸溶液に合し，水を加えて15ccとした．この検液1ccは34.2c.p.m.（昭和31年6月12日測定）を示した．検液10ccをとり水を加えて100ccとし，担体としてCa^{+2} 20mg, Sr^{+2} 10mg, Ba^{+2} 10mgを加え，濃アンモニア水でpH. 6とし，ここに生じた沈澱（燐酸塩）を遠心分離し，上清は炭酸ナトリウム1gを加え，アンモニア水でpH. 8とした後，遠心分離し，上清は蒸発乾固した（Fr. 1）．沈澱は硝酸5滴および水23ccに溶かし，発烟硝酸77ccを加えて30分間かきまぜ，グラスフィルターで沪過し，沈澱は水10ccに溶かした後，蒸発乾固した（Fr. 2）．沪液はそのまま蒸発乾固した（Fr. 3）．燐酸塩の沈澱は，これに更に担体としてSr^{+2} 10mg, Ba^{+2} 10mgを加え発烟硝酸による沈澱法を3回繰返し，沈澱はそれぞれ水10ccに溶かし，蒸発乾固し（Fr. 4, 5, 6），沪液は蒸発乾固（Fr. 7）して，放射能を測定した（Table 1）．

Table 1.　Separation of ^{89}Sr and ^{90}Sr Fraction.

ここでSrの全部又は一部がpH 6で沈澱する燐酸塩の部分に，そして一部がその上清に．あるいは移行するかもしれない．従つてFr. 2, 4, 5, 6がSrのフラクションである．

実験 2. 陽イオン交換樹脂による $^{89}Sr+^{90}Sr$ の分離

灰分0.4675g（検体No. 31）をN/5塩酸に溶かし，不溶物は遠心分離して除き，これをN/5塩酸で十分洗い，洗液は前記溶液に合し，N/5塩酸を加えて25ccとする．この検液0.5ccは29.9c.p.m.（昭和31年5月14日測定）を示した．検液10ccを塩酸（1：2）でH型としたAmberlite IR-120の層（径1cm，長さ17cm，80～120mesh）に流した．続いて，N/5塩酸50cc，0.5%蓚酸300cc，塩酸でpH3.8に調節した5%クエン酸アンモニウム溶液350cc，同じくpH6.0の5%クエン酸アンモニウム溶液450ccで溶離した後，それぞれ蒸発乾固した．残留物を硫硝酸を加えて灰化し，塩酸を加えて水浴上で蒸発乾固し，水に溶かして試料皿に移し，蒸発乾固した後放射能を測定したその結果をTable 2に示す．

Table 2. Separation of ^{89}Sr and ^{90}Sr Fraction by the use of Amberlite IR-120

Table 3. Contamination by Radioactivity in Liver.

No.	Date of Sampling	Period of Fishing	Area of Fishing	Name of Fish
1	'56. 3. 5	'56. 1. 23～'56. 2. 9	N. 8°00′～W. 166°00′ N. 7°00′～W. 161°00′	Mebachi
2	〃	1. 28 ～ 2. 19	N. 7°30′～E. 138°30′ N. 3°45′～E. 144°40′	Kihada, etc.
3	〃	1. 30 ～ 2. 18	N. 8°46′～E. 152°25′ N. 1°39′～E. 149°46′	Kihada
4	3. 9	1. 28 ～ 2. 12	N. 7°06′～W. 159°01′ N. 9°15′～W. 168°30′	Bachi
5	〃	1. 31 ～ 2. 20	S. 2°00′～E. 142°00′ S. 3°30′～E. 146°00′	Kihada
6	〃	2. 10 ～ 2. 20	N. 10°15′～E. 176°00′ N. 9°00′～E. 176°00′	Bachi
7	〃	2. 4 ～ 2. 21	S. 4°41′～E. 161°40′ S. 4°15′～E. 162°35′	Kihada
8	3. 16	2. 5 ～ 2. 25	N. 1°30′～E. 152°30′ N. 3°30′～E. 156°00′	unidentified
9	〃	1. 21 ～ 2. 23	S. 9°30′～E. 165°20′ S. 8°30′～E. 163°50′	Kihada
10	〃	2. 7 ～ 2. 22	N. 7°10′～E. 166°08′ N. 8°00′～E. 167°30′	Bachi
11	〃	2. 11 ～ 3. 8	N. 23°00′～E. 150°00′ N. 20°00′～E. 151°00′	Mebachi
12	〃	1. 20 ～ 2. 25	S. 10°10′～E. 179°40′ S. 1°20′～E. 175°00′	
15	3. 24	2. 16 ～ 3. 4	N. 3°04′～E. 152°35′ N. 10°00′～E. 154°41′	Mebachi
16	〃	2. 18 ～ 3. 4	N. 8°52′～E. 150°58′ N. 5°10′～E. 154°35′	Kihada
17	〃	2. 11 ～ 3. 5	S. 5°00′～E. 120°00′ S. 8°00′～E. 125°00′	Kihada
18	〃	2. 10 ～ 3. 6	N. 3°30′～E. 157°30′	Mebachi, etc.
19	〃	2. 16 ～ 3. 8	N. 2°10′～E. 152°10′ N. 2° ～E. 160°00′	Kihada
20	〃	2. 26 ～ 3. 10	N. 8°30′～E. 152°04′ N. 2°55′～E. 154°04′	Kihada
21	〃	2. 29 ～ 3. 18	N. 19°30′～E. 145°10′ N. 22°30′～E. 147°00′	Mebachi
22	4. 4	2. 25 ～ 3. 19	S. 4°02′～E. 159°06′ S. 2°53′～E. 161°11′	Kihada
23	〃	2. 25 ～ 3. 14	N. 0°10′～E. 151°30′ N. 6°15′～E. 143°30′	Kihada
24	〃	3. 1 ～ 3. 13	N. 8°25′～E. 154°36′ N. 7°54′～E. 155°13′	Mebachi
25	〃	2. 27 ～ 3. 12	N. 4° ～E. 148° N. 6° ～E. 154°	Kihada. etc.
27	〃	3. 2 ～ 3. 17	N. 11°20′～E. 151°30′ N. 6°40′～E. 147°40′	Kihada,
28	〃	3. 2 ～ 3. 16	N. 2°00′～E. 141°30′ N. 4°30′～E. 143°30′	Kihada,
29	〃	2. 28 ～ 3. 13	N. 4°30′～E. 155°30′ N. 5°30′～E. 154°00′	Kihada etc.
30	〃	3. 4 ～ 3. 19	N. 3°03′～E. 145°58′ N. 6°04′～E. 144°20′	Kihada
31	〃	2. 23 ～ 3. 20	S. 3°00′～E. 147°00′ N. 7°00′～E. 149°00′	Kihada
32	〃	3. 2 ～ 3. 19	N. 5°30′～E. 155°00′ N. 3°30′～E. 165°00′	Kihada
33	〃	3. 10 ～ 3. 15	N. 1°20′～E. 130°30′ N. 2°00′～E. 131°20′	Kihada
34	4. 17	3. 5 ～ 3. 25	N. 1°30′～E. 153°47′ N. 5°25′～E. 146°35′	Kihada

Wet (Whole)			Wet		Dried		Ashed		
c.p.m.	c.p.m.*1	Weight	c.p.m.	c.p.m.*1	c.p.m.	c.p.m.*1,2	c.p.m.	c.p.m.*1,3	Weight*4
6.2	2.9	27	0	0	0	0 (0)	6.2	2.9 (0.1)	0.4778 (0.0220)
24.2	11.5	139	9.7	4.6	23.3	11.0 (3.4)	78.7	37.3 (0.2)	0.5667 (0.0351)
14.5	6.9	92	0	0	2.6	1.2 (0.3)	30.4	14.4 (0.50)	0.7356 (0.0427)
3.1	1.5	232	0	0	0	0 (0)	0	0 (0)	0.3157 (0.0183)
13.2	6.3	231	4.4	2.1	0	0 (0)	6.6	3.1 (0.1)	0.3201 (0.0169)
17.2	8.2	149	0	0	0	0 (0)	16.7	7.9 (0.5)	0.3125 (0.0188)
0	0	82	4.8	2.3	0.9	0.4 (0.1)	12.3	5.8 (0.3)	0.2394 (0.0134)
18.9	9.0	112	0	0	4.8	2.3 (0.6)	12.8	6.1 (0.3)	0.3331 (0.0180)
0	0	267	0	0	7.5	3.6 (1.2)	39.6	17.5 (1.3)	0.2104 (0.0143)
16.3	7.7	82	7.5	3.6	0	0 (0)	33.9	16.1 (0.9)	0.3308 (0.0179)
16.3	7.7	64	6.6	3.1	5.3	2.5 (0.7)	10.6	5.0 (0.3)	0.2184 (0.0118)
13.6	6.5	184	0	0	10.6	5.0 (1.5)	7.9	3.7 (0.2)	0.2600 (0.0156)
6.6	3.1	207	0	0	6.6	3.1 (4.9)	32.6	14.5 (0.9)	0.2643 (0.0153)
5.2	2.5	129	2.6	1.2	0	0 (0)	12.8	6.1 (0.3)	0.2416 (0.0116)
7.9	3.7	105	2.2	1.0	0	0 (0)	7.9	3.7 (0.2)	0.2500 (0.0150)
1.8	0.9	223	4.1	1.9	0	0 (0)	13.6	6.5 (0.3)	0.1962 (0.0098)
4.4	2.1	141	0	0	0	0 (0)	19.8	9.4 (0.5)	0.2161 (0.0125)
4.0	1.9	145	1.3	0.6	0	0 (0)	6.2	2.9 (0.2)	0.1390 (0.0080)
0	0	139	10.6	5.0	1.3	0.6 (0.2)	44.9	21.3 (1.2)	0.1222 (0.0071)
3.5	1.7	81	0	0	3.5	1.7 (0.4)	9.7	4.6 (0.4)	0.1669 (0.0145)
6.2	2.9	48	0	0	0	0 (0)	0	0 (0)	0.0885 (0.0086)
3.1	1.5	174	3.5	1.7	8.8	4.2 (1.1)	16.7	7.9 (0.7)	0.2704 (0.0234)
0	0	194	0	0	4.1	1.9 (0.05)	39.2	18.6 (1.7)	0.1078 (0.0129)
6.6	3.1	225	4.0	1.9	12.3	5.8 (1.7)	53.2	25.2 (0.2)	0.1645 (0.0159)
10.1	4.8	223	0	0	0	0 (0)	19.4	9.2 (0.9)	0.1300 (0.0130)
0	0	90	0	0	1.8	0.9 (0.2)	2.2	1.0 (0.1)	0.1455 (0.0146)
0	0	208	0	0	4.4	2.1 (0.6)	11.9	5.6 (4.6)	0.1319 (0.0128)
45.3	21.5	109	5.7	2.7	31.2	14.8 (3.5)	168.0	79.6 (6.4)	0.1342 (0.0147)
0	0	162	0	0	3.5	1.7 (0.05)	14.5	6.9 (0.7)	0.1762 (0.0164)
0	0	120	0	0	0	0 (0)	6.2	2.9 (0.3)	0.1120 (0.0112)
24.6	11.7	986	0	0	0	0 (0)	9.2	4.4 (0.4)	0.1275 (0.0119)

No.	Date of sampling	Period of Fishing	Area of Fishing	Name of Fish
35	4. 17	3.13～ 3.26	N. 2°55′～E. 135°30′ N. 3°20′～E. 136°30′	Kihada
36	〃	3.15～ 3.28	N. 3°30′～E. 156°20′ N. 5°30′～E. 159°00′	Kihada
37	〃	3. 8～ 3.21		Indomaguro
38	5. 9	3.17～ 4. 5	N. 1°52′～E. 158°52′ N. 5°10′～E. 160°48′	Kihada
39	〃	3.16～ 4. 7	N.10°18′～W. 176°30′ N. 6°40′～E. 176°30′	Kihada
40	〃	3.25～ 4.11	N. 3°00′～E. 153°00′ N. 9°00′～E. 155°20′	Kihada, etc.
42	〃	3.31～ 4.17	N. 3°30′～E. 142°30′ N. 7°30′～E. 140°30′	Mebachi
43	〃	3.23～ 4.16	N. 4°10′～E. 156°00′ S. 0°30′～E. 161°00′	Mebachi, etc.
44	〃	3.26～ 4.19	N. 5°00′～E. 156°00′	Mebachi
45	〃	4. 1～ 4.20	N. 0°00′～E. 156°00′ N. 2°30′～E. 159°00′	Kihada, etc.
46	〃	4. 1～ 4.20	N. 3°00′～E. 160°00′ N. 2°00′～E. 145°00′	Kihada
47	〃	4. 3～ 4.21	N. 2°30′～E. 156°06′ N. 3°15′～E. 159°50′	Kihada, etc.
48	〃	4. 8～ 4.25	N. 3°40′～E. 143°00′ N. 7°30′～E. 145°00′	
49	〃	4. 8～ 4.26	N. 3°30′～E. 152°00′ N. 4°00′～E. 153°00′	Kihada
50	6. 10	3.29～ 4.26	N. 1°51′～E. 149°09′ N. 3°42′～E. 154°52′	Kihada
52	〃	4.15～ 5. 6	N. 4°19′～E. 146°44′ N. 9°41′～E. 149°44′	Mebachi
53	〃	4. 9～ 5.11	S. 0°50′～E. 136°22′ N. 0°34′～E. 139°27′	Mebachi
54	〃	4.29～ 5.18	N. 4°30′～E. 158°30′ N. 6°30′～E. 160°30′	Kurokawa
55	〃	4. 3～ 5.18	S.15°10′～E. 165°15′ S.13°10′～E. 164°52′	Kihada
56	6. 19	4.21～ 5.27	S. 0°30′～E. 158°00′ S. 2°30′～E. 162°00′	Kihada
57	〃	5. 9～ 5.30	N. 2°41′～E. 157°29′ N. 6°21′～E. 157°45′	Kihada
58	〃	5. 7～ 5.26	S. 2°31′～E. 135°11′ S. 1°40′～E. 135°00′	Kihada, etc.
60	6. 28	5. 8～ 6. 3	N. 2°30′～W. 158°00′ S. 3°00′～W. 164°00′	
61	〃	5.20～ 6. 6	N. 9°25′～E. 169°55′ N. 7°37′～E. 177°40′	Mebachi, etc.
63	7. 18	5.23～ 6.10	N. 2°07′～W. 172°13′ N. 2°41′～W. 172°28′	Kihada
64	〃	6.12～ 6.30	N. 0°30′～E. 162°10′ S. 1°30′～E. 159°20′	Kihada
65	8. 1	6.13～ 7.15	S. 5°30′～E. 160°05′ N. 4°30′～E. 150°00′	Kihada
66	〃	6.18～ 7.10	N. 1°15′～W. 172°20′ N. 4°18′～W. 176°35′	Kihada
67	〃	7. 4～ 7.17	N. 4°50′～E. 146°27′ N. 6°30′～E. 146°47′	Kurokawa
68	10. 5	7.18～ 8. 7	N. 6°30′～W. 175°00′ N. 7°00′～W. 173°30′	Kihada
69	〃	8. 3～ 8.22	N.10°30′～E. 172°00′ N. 8°30′～E. 173°00′	Mebachi

Wet (Whole)			Wet		Dried		Ashed		
c. p. m.	c.p.m.*[1]	Weight	c. p. m.	c. p. m. *[1]	c. p. m.	c.p.m. *[1,2]	c. p. m.	c.p. m. *[1,3]	Weight*[4]
16.7	7.9	164	0	0	0	0 (0)	9.2	4.4 (0.4)	0.1144 (0.0111)
9.7	4.6	147	0	0	7.0	3.3 (0.8)	0	0 (0)	0.1227 (0.0098)
4.4	2.1	339	8.4	4.0	18.0	8.5 (2.6)	0	0 (0)	0.0967 (0.0097)
9.2	4.4	109	2.2	1.0	5.9	2.8 (0.6)	11.8	5.6 (0.4)	0.1576 (0.0105)
0	0	110	14.5	6.9	11.8	5.6 (1.6)	68.2	32.3 (3.0)	0.1839 (0.0172)
35.2	16.3	139	1.6	0.7	0.5	0.2 (0.05)	194.0	91.9 (8.2)	0.1771 (0.0159)
3.1	1.5	174	10.1	4.8	0	0 (0)	66.6	31.6 (2.5)	0.1484 (0.0119)
7.9	3.7	214	5.9	2.8	3.8	1.8 (0.4)	16.7	7.9 (0.7)	0.0615 (0.0051)
18.0	8.5	67	0	0	4.3	2.0 (0.4)	70.4	33.4 (2.3)	0.1196 (0.0084)
0	0	100	8.8	4.2	7.0	3.3 (1.0)	33.9	16.1 (1.6)	0.1275 (0.0128)
13.2	6.3	151	4.4	2.1	11.3	5.4 (1.3)	37.1	17.6 (1.5)	0.1246 (0.0104)
3.5	1.7	147	0	0	15.6	7.4 (2.0)	33.9	16.1 (1.5)	0.1290 (0.0120)
4.0	1.9	134	0	0	1.6	0.8 (0.2)	182.7	86.6 (6.9)	0.1462 (0.0117)
8.8	4.2	144	1.3	0.6	11.8	5.6 (1.4)	37.1	17.6 (1.4)	0.1219 (0.0098)
0	0	187	4.8	2.3	16.7	7.9 (1.8)	37.6	17.8 (1.3)	0.1565 (0.0115)
7.0	3.3	64	7.4	3.5	20.1	9.5 (1.9)	88.4	41.9 (2.8)	0.2122 (0.0141)
1.1	0.5	83	0	0	0	0 (0)	11.2	5.3 (0.4)	0.2136 (0.0157)
14.0	6.6	266	2.6	1.2	3.6	1.7 (0.5)	9.8	4.6 (0.4)	0.2237 (0.0216)
9.1	4.3	106	4.8	2.2	3.6	1.7 (0.5)	15.8	7.5 (0.7)	0.1910 (0.0185)
5.5	2.6	19	0	0	0	0 (0)	4.3	2.0 (0.1)	0.2389 (0.0159)
6.0	2.8	83	0	0	4.5	2.1 (0.5)	9.3	4.4 (0.4)	0.1504 (0.0125)
11.0	5.2	178	0	0	0	0 (0)	5.0	2.4 (0.2)	0.0757 (0.0071)
8.1	3.8	183	0	0	9.8	4.6 (1.3)	10.5	5.0 (0.5)	0.1574 (0.0147)
0	0	115	3.8	1.8	4.8	2.3 (0.7)	16.0	7.6 (0.7)	0.1444 (0.0135)
0	0	171	0.7	0.3	6.7	3.2 (0.9)	18.4	8.7 (0.9)	0.1857 (0.0180)
3.6	1.7	67	9.6	4.6	0.5	0.2 (0.05)	15.8	7.5 (0.5)	0.1757 (0.0117)
13.9	6.6	43	1.2	0.6	3.6	1.7 (0.7)	17.2	8.2	
0	0	145	0.2	0.1	10.8	5.1 (1.2)	49.5	23.5	
6.0	2.8	127	0	0	0.5	0.2 (0.05)	14.6	6.9	
6.5	3.1	127	1.9	0.9	5.4	2.6 (0.7)	14.5	6.9 (0.6)	0.1621 (0.0146)
8.4	4.0	164	1.8	0.9	4.2	2.0 (0.6)	10.2	4.8 (0.5)	0.1042 (0.0104)

No.	Date of Sampling	Period of Fishing		Area of Fishing	Name of Fish
70	〃	7. 30～	9. 2	S. 4°02′～W. 128°10′ S. 5°45′～W. 152°00′	Mebachi
71	〃	8. 24～	9. 12	N. 4°11′～E. 177°20′ N. 8°00′～E. 179°00′	Kihada
72	10. 5	9. 1～	9. 18	N. 4°00′～E. 158°00′ N. 8°00′～E. 157°00′	Kihada
75		'57. 1. 17～	'57. 2. 14	N. 2°25′～E. 166°07′ S. 3°36′～E. 188°10′	Kihada
76		2. 1～	2. 16	N. 9°30′～W. 176°25′ N. 11°00′～W. 179°30′	Mebachi, etc.
80	5. 15	4. 15～	4. 30	N. 12°00′～E. 165°00′	Kurokawa, etc,
81	〃	4. 12～	4. 29	S. 1°05′～E. 165°00′	Bachi, etc.
82	5. 22	4. 6～	4. 25	S. 1°54′～E. 166°02′ S. 0°30′～E. 164°48′	Kihada
83	〃	4. 1～	4. 30	S. 3°00′～E. 129°00′	Bachi
84	〃	5. 1～	5. 10	N. 4°00′～E. 145°00′	Kihada
86	〃	4. 20～	5. 10	N. 1°50′～E. 149°40′ N. 6°20′～E. 145°20′	Bachi, etc.
87	〃	4. 27～	5. 9	N. 5°00′～E. 160°00′ N. 6°00′～E. 165°00′	Bachi

* 1 : To compare with previous report, the counts of an efficiency of 10 percent of actual disinte
* 2 : To compare with previous report, the counts of dried matter corresponded to 1 gram of wet
* 3 : To compare with previous report, the counts of ashed matter corresponded to 1 gram of wet
* 4 : The weight of ashed matter corresponded to 1 gram of wet sample is written in parentheses.

Wet (Whole)			Wet		Dried		Ashed		
c. p. m.	c.p.m.*1	Weight	c. p. m.	c. p. m. *1	c. p. m.	c. p. m*1,2	c. p. m.	c.p. m. *1.3	Weight*4
4.9	2.3	231	1.4	0.7	0.7	0.3 (0.1)	6.9	3.3 (0.3)	0.1464 (0.0136)
7.2	3.4	150	3.2	1.5	7.5	3.6 (1.0)	20.5	9.7 (0.9)	0.0886 (0.0083)
11.0	5.2	179	2.9	1.4	4.3	2.0 (0.6)	20.0	9.5 (0.8)	0.1290 (0.0112)
1.9	0.9	50	0	0	0	0 (0)	12.3	5.7 (1.3)	0.1849
5.4	2.5	50	0	0	3.5	1.6 (0.5)	18.6	8.6 (1.9)	0.1186
2.0	0.9	80	0.6	0.3	6.8	3.1 (1.0)	25.1	11.6 (2.5)	0.1818
9.4	4.3	230	0	0	0	0 (0)	3.7	1.7 (0.4)	0.1786
1.7	0.8	79	0.7	0.3	1.2	0.6 (0.2)	8.4	3.9 (0.4)	0.0948 (0.0100)
2.4	1.1	164	0	0	2.3	1.1 (0.7)	7.3	3.4 (0.3)	0.1522 (0.0148)
3.8	1.7	55	0.2	0.1	1.8	0.8 (0.2)	9.3	4.3 (0.4)	0.0965 (0.0094)
4.8	2.2	103	2.7	1.2	2.9	1.3 (0.3)	7.3	3.4 (0.3)	0.1201 (0.0091)
9.7	4.4	81	1.4	0.6	6.5	3.0 (0.7)	21.2	9.8 (0.8)	0.1877 (0.0156)

rgration are shown in these columns.

sample is written in parentheses.

sample is written in parentheses.

む す び

南太平洋で捕獲されたマグロ類，カジキ類の肝臓の放射能汚染を調査した．その結果，1956 年度のビキニ環礁における原水爆実験前後の検体の間には，放射能汚染度の差異は認められなかつた．

文 献

1) 長沢佳熊：衛試，74，213 (1956).
2) Printed given by Harley, John H., in U. S. Atomic Energey Commision, New York Operation Office, Health and Safety Laboratory.
3) Tomskins, E. R., et al. : *J. Am. Chem. Soc.* 69, 2769 (1947). *ibid*, 70, 3521 (1949).

Summary

The radio-contamination in Seventy-four livers of tunny and sword fish caught in Southern Pacific Ocean was tested. As a result, the significant difference of radio activity between samples got before and after the H-bomb explosion tests at Bikini Atoll in 1956 was not found.

Received June 18, 1957

水の放射能測定試料の作成法
(附　水道水及び雨水の放射能)

河村正一，野崎泰彦

Preparation of Sample for Radioactivity Measurement from Water. Radioactivity in City and Well Waters in Tokyo.

Shōichi KAWAMURA and Yasuhiko NOZAKI

水道水や井戸水を蒸発して放射能を測定する場合に蒸発濃縮の末期に多量の沈澱を生じ，この沈澱の一部は器壁に固く着いて，水又は酸で洗つても完全に試料皿に移すことができないので放射能の一部が蒸発の途中で失われる可能性がある．著者らはこのことを確かめ，更にこれを防ぐためにストロンチウム-89を加えた水道水にEthylenediamine tetraacetic acid（以下E. D. T. A. と略称する）を添加し，或いは容器をシリコンで処理してストロンチウム-89の回収率を比較し，その結果試料の水にE. D. T. A. を添加し．シリコン処理した容器で濃縮する方法が最も満足すべき結果が得られることを知つた．

実験結果

対照試験

3*l* の三角フラスコに水道水1*l* 及び約1500c. p. m. /cc の $Sr^{89}Cl_2$（以下Sr^{89}と略称する)をシリコン処理したピペット（処理法は後述の三角フラスコ，蒸発皿のシリコン処理と同じ）で加え，蒸発して約200ccに濃縮した後，蒸発皿に移し赤外線灯で乾燥し，縁の内側に信越化学製シリコンKF-400を塗つて約250°C 1時間乾燥した試料皿[1]（以下試料皿はすべてこのように処理したものを用いる）に移し放射能を測定した．この測定値をSr^{89}の崩壊に対して補正した理論値と比較して回収率を定めた．放射能の測定はすべて神戸工業株式会社製100進法のガイガーカウンターを用いた．測定時間は試料30分間自然計数30分間で，マイカ窓厚1.58mg/cm²，試料とマイカ窓までの距離1cmで効率はNational Bureau of StandardsのRaD+E標準で約10.1％である．この実験で得たSr^{89}の回収率をTable 1に示す．

Table 1. Recovery of $Sr^{89}Cl_2$ added to 1*l* of City Water.

No.	Added			Found		Recovery
	Date	Net c. p. m.	Corrected c.p.m. for Decay	Date	Net c. p. m.	(%)
1	Oct. 24, 1956 (12.00)	2289.1	2146.7	Nov. 1, 1956 (12.00)	1889.7	88.0
2	Nov. 15, 1956 (13.00)	1464.1	1338.2	Nov. 22, 1956 (13.00)	1092.6	81.6
3	Nov. 22, 1956 (10.00)	1185.3	1111.3	Nov. 27, 1956 (10.00)	1017.2	91.5
4	Nov. 28, 1956 (15.00)	1269.9	1160.7	Dec. 5, 1956 (15.00)	1072.1	92.3
5	Dec. 5, 1956 (10.00)	1526.4	1395.1	Dec. 7, 1956 (10.00)	1258.5	90.2

E. D. T. A. を加えたときの回収率

試料1*l* にE. D. T. A. 2 Na 5×10^{-4} M. を加えて対照と同一方法で行なつた実験結果をTable 2に示す．なお，E. D. T. A. 2Na の最小使用量を決めるため井戸水，水道水 1*l* にE. D. T. A. 2Na を種々の割合で加えたときの

沈澱の有無をしらべたところ E. D. T. A. 2Na 5×10^{-4}M. 以上では 200cc に濃縮しても沈澱を生じなかつたのでこの値を用いた.

Table 2. Recovery of $Sr^{89}Cl_2$ added to 1l of City water, in which E. D. T. A. being added.

No.	Added			Found		Recovery
	Date	Net c. p. m.	Corrected c.p.m. for Decay	Date	Net c. p. m.	(%)
6	Oct. 24, 1956 (12.00)	2592.0	2430.7	Nov. 1, 1956 (12.00)	2412.8	99.2
7	Nov. 15, 1956 (13.00)	1464.1	1338.2	Nov. 22, 1956 (13.00)	1144.4	85.5
8	Nov. 22, 1956 (10.00)	1185.3	1111.3	Nov. 27, 1956 (10.00)	1112.9	100.1
9	Nov. 28, 1956 (15.00)	1269.9	1160.7	Dec. 5, 1956 (15.00)	1159.6	99.9
10	Dec. 5, 1956 (10.00)	1526.4	1395.1	Dec. 7, 1956 (10.00)	1347.1	96.5

蒸発容器をシリコンで処理したときの回収率

清浄にした 3l の三角フラスコの内面を信越化学製シリコン KF-400 の 1%ベンゼン溶液で一様に濡し，滴を切り溶媒が揮発した後，250°C で 1 時間加熱した．この容器に試料 1l を入れ約 200cc に濃縮した後，三角フラスコと同様にシリコン処理した蒸発皿に移し赤外線灯で約 2 cc に濃縮し試料皿に移し蒸発乾固し放射能を測定し回収率をしらべた．その結果を Table 3 に示す．

Table 3. Recovery of $Sr^{89}Cl_2$ added to 1l of City water, vessels being coated with silicone resin.

No.	Added			Found		Recovery
	Date	Net c. p. m.	Corrected c.p.m. for Decay	Date	Net c. p. m.	(%)
11	Oct. 24, 1956 (12.00)	2242.8	2103.2	Nov. 1, 1956 (12.00)	2243.5	106.6
12	Nov. 15, 1956 (13.00)	1464.1	1338.2	Nov. 22, 1956 (13.00)	1184.1	88.4
13	Nov. 22, 1956 (10.00)	1185.3	1111.3	Nov. 27, 1956 (10.00)	1025.7	92.2
14	Nov. 28, 1956 (15.00)	1269.9	1160.7	Dec. 5, 1956 (15.00)	1189.6	102.4
15	Dec. 5, 1956 (10.00)	1526.4	1395.1	Dec. 7, 1956 (10.00)	1417.4	101.6

試料にE. D. T. A. を添加しシリコン処理した容器を用いたときの回収率

E. D. T. A. 5×10^{-4} M. を加えた試料 1l をシリコン処理した容器で濃縮した後，シリコン処理した蒸発皿に移し赤外線灯で約 2 cc に濃縮し試料皿に移し蒸発乾固し放射能を測定し回収率をしらべた．その結果を Table 4 に示す．

Table 4. Recovery of $Sr^{89}Cl_2$ added to 1*l* of City water E. D. T. A. being added and vessels being coated with silicone resin.

No.	Added			Found		Recovery
	Date	Net c. p. m.	Corrected c.p.m. for Decay	Date	Net c. p. m.	(%)
16	Oct. 24, 1956 (12.00)	2181.7	2045.9	Nov. 1, 1956 (12.00)	2063.1	100.8
17	Nov. 15, 1956 (13.00)	1464.1	1338.2	Nov. 22, 1956 (13.00)	1398.9	104.5
18	Nov. 22, 1956 (10.00)	1185.3	1117.7	Nov. 27, 1956 (10.00)	1096.4	98.1
19	Nov. 28, 1956 (15.00)	1269.9	1160.7	Dec. 5, 1956 (15.00)	1180.9	101.7
20	Dec. 5, 1956 (10.00)	1526.4	1395.1	Dec. 7, 1956 (10.00)	1379.8	98.9

考　　察

水の放射能を測定するために普通行われているように蒸発濃縮，乾固するとき，析出した固形物の一部は器壁に固くついて，水や稀酸などで洗つてもとけず，従つてこの析出物の中に含まれる放射能は当然検出されない危険があるが，このことは上に述べた対照実験で明らかとなつた．

これをさける一つの方法は沈澱の析出を防ぐことであるが，水道水や井戸水の塩類の相当の部分はカルシウム塩であるから，これと結合して可溶性にする試薬としてE. D. T. A. を用いた．しかしE. D. T. A. の量をあまり増すと蒸発の最後には結局析出物が多くなり自己吸収を増す原因となるので最低必要量を用いる必要がある．この量は水道水に対してはE. D. T. A. 2Naの 5×10^{-4} M. と定められた．この濃度では析出物は蒸発の終期にも濁りの程度に止まる．

第2の方法は，かりに析出物を生じても蒸発容器の壁に附着しないようにすることで，これは容器をシリコン処理することによつてかなりの程度に改善されることはTable 3 の示すとおりである．しかしこの2つの方法は単独に用いたときはまだ充分とはいい難いので，両者を組合せてはじめてTable 4 の示すように満足すべき回収率を以つて放射能を測定し得る．又この方法を用いて東京都世田谷区玉川用賀町附近の井戸2ヵ所，水道1ヵ所より採取した水の放射能を昭和31年3月22日から8月25日迄連日測定した．この間に核爆発実験が行われ，その都度，雨水中には相当放射能の増大がみられたにもかかわらず前記，井戸，水道中に認め得べき放射能を検出し得なかつた，この事は雨水が地層或いは水道の沪過装置を通過するとき放射能物質の殆んど全部が消失することを示すものと考えられる．

文　　献

1) 木村健二郎，斎藤信房，立花太郎，大沢潤子，柴田長夫：分析化学 2，92−96 (1953).

Summary

In the preparation of sample of water for radioactivity measurement, some radioactive substance is lost, owing probably to the residue coherent to the wall of evaporation vessels.

This trouble is avoided by adding E. D. T. A. to 5×10^{-4} M and by coating the vessels with silicone resin.

No radioactivity contamination was found in well and city water in Tokyo from March 22 to Aug. 25, 1956, while radioactivity was detected in rains.

Received June 18, 1957

糖燐酸エステル中の不純物について

朝比奈正人，山羽　力

Impurities in Some Sugar Phosphates

Masato Asahina and Tsutomu Yamaha

まえがき　Khym等は糖が Borate と結合することを利用して糖[1]や糖燐酸エステル[2]の陰イオン交換樹脂によるクロマトグラフィを行つているが，この方法を少し変えて用い，若干の輸入市販糖燐酸エステル中の不純物について二,三の知見を得た．

実験方法　グルコース-1-燐酸（G-1-P）はカリウム塩，グルコース-6-燐酸（G-6-P），フラクトース-6-燐酸（F-6-P），フラクトース-1,6-二燐酸（F-1,6-P）はバリウム塩でいずれも市販品を用いたが，G-6-P（Ba塩）はグルコースから合成[3]したものも用いた．

イオン交換樹脂クロマトグラフィ[2]には試料を少量の水に溶かし，Dowex 50 のカラム（H型，100～200メッシュ，1×5cm）を通し遊離酸とし，アンモニア水で pH 約9とした後，Dowex 1-×8のカラム(Cl型，200～400メッシュ，1×2.2cm）に通し，0.001M NH_4OHで洗い Free Sugar だけを流し出す．以下順次0.025M NH_4Cl と0.01M $Na_2B_4O_7$ の混液でG-1-P を，0.025M NH_4Cl と 0.001M $Na_2B_4O_7$ と 0.0025M NH_4OHの混液でG-6-P を，0.025M NH_4Cl の液で F-6-P を，少量の水で洗つた後 0.02M HCl と 0.02M NaCl の混液で F-1,6-P を溶出する．溶出液は以上の4種のみを用いたから，各区分中に他の未知の糖燐酸エステル等が混入することも考えられる．流速は 1 ml/min で，溶出液は 10ml 宛とり，各区分は約20本宛とる．回収率はクロマトグラフィの前後に Anthrone 法で調べると 95% 以上である．Dowex 1 の代りに Amberlite IRA400（100～200メッシュ）を用いてもほぼ同様な結果を得る．

溶出液の発色定量は，無機燐酸（inorg P）に対しては Fiske Subbarow 法，糖及び糖燐酸エステルにはAnthrone法[4]を用いた．なお Anthrone 法では糖は燐酸エステルとなつてもモル当りの発色は同じであるとし[5]又ここで行なつた実験条件ではグルコースとフラクトースの発色の比は 1：1.27 であるとして計算した．その他山の同定のためにフラクトース誘導体には Roe 法[6]還元力の有無にはFolin-Malmros 法[7]も併用した．

実験結果　G-1-P，F-6-P，F-1,6-P 各 5mg，G-6-P（市販品）8.3mg を混合しクロマトグラフィーを行なつた結果を Fig. 1 に示す．なお G-1-P 5mg と KH_2PO_4 2mg を用いた両者の分離の様子を Fig. 2 に示す．

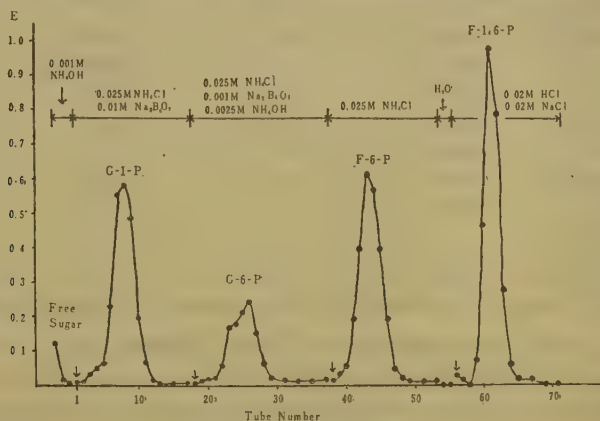



Fig. 1. Chromatography of the Mixture of G-1-P, G-6-P, F-6-P and, F-1,6-P

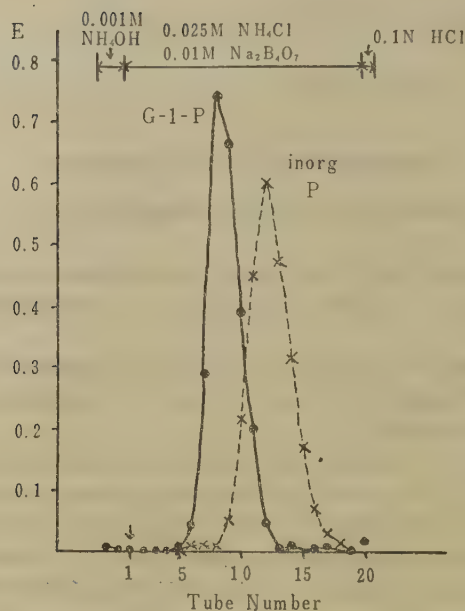



Fig. 2. Chromatography of the Mixture of G-1-P and inorg. P

次に各糖燐酸エステル 5～15mg を用いそれぞれクロマトグラフィを行い，各山の大きさから各成分のモル数を計算し更にモル比を出してみると Table 1 のようになる．ただし無機燐酸と Anthrone 陽性の物質以外の不純物については全く考慮に入れてない．

Table 1. Impurities in Some Sugar Phosphates

Preparations / Components	G-6-P (commercial) mol ratio	G-6-P (synthesized) mol ratio	F-6-P (commercial) mol ratio	F-1,6-P (commercial) mol ratio
Free Sugar (G)	0.07	0.01	0.03	0.03
G-1-P (G)	0	0	0.13	0
G-6-P (G)	1.00	1.00	0.20	0.04
F-6-P (F)	0.14	0.16	1.00	0.10
F-1,6-P (F)	0.76	0	0	1.00
inorg. P (P)	1.44	0.02	0.04	0.11
other Anthrone positive substances (G)	0.08	0	0	0.01

(G), (F). and (P) mean to be calculated as glucose, fructose and inorganic phosphate respectively.

考察　各種燐酸エステルは一般に他の糖燐酸エステル，遊離糖，無機燐酸を含むが，ここで用いた市販 G-6-P は著しく不純で多量の F-1,6-P と無機燐を含み，その他F-6-Pと Free Sugar を少し含んでおり，G-6-P は重量で26%位にしか相当しない．合成した G-6-P でも少量の F-6-P が含まれることは合成中の異性化も考えねばならぬ．F-6-P 中の G-1-P は溶出速度が少し早いこと，例えば Fig. 1 で G-1-P の山の左に肩ができるし（G-1-P のみではできない），又カラムを長くすると（1×5cm）G-1-P と別の山になることから G-1-P ではないと思わ

れる．しかしやはり還元力はない．G-1-P については詳細に調べなかつたが，Fig. 2 からわかるように比較的純粋で少なくも Free Sugar や他の糖燐酸エステルは殆んど含まれていない．(0.1N HCl 10cc で全部洗い出されるがその中には Anthrone 法で発色する物質は殆んどなかつた）

以上のように市販糖燐酸エステルには著しく不純なものがあるから使用の際には注意を要する． 又われわれはこのクロマトグラフィを応用して，大腸菌の抽出液によつてグルコサミン -6- 燐酸から生じた糖燐酸エステルが，G-6-P と F-6-P の混合物であることを証明した[8]．

総 括 陰イオン交換樹脂クロマトグラフィを用いて数種の市販糖燐酸エステル中の遊離糖や他の糖燐酸エステルや無機燐の量を半定量的に調べ，著しく不純のものもあることを知つた．

文　献

1) Khym, J. X., Zill, L. P. : *J. Amer. Chem. Soc.*, 74, 2090 (1952)
2) Khym, J. X., Cohn, W. E. : *ibid*, 75, 1153 (1953)
3) Seegmiller, J. E., Horecker, B. L. : *J. Biol. Chem.*, 192, 175 (1951)
4) Morris, D. L. : *Science*, 107, 254 (1948)
5) Mokrasch, L. C. : *J. Biol. Chem.*, 208, 55 (1954)
6, 7) Umbreit, W. W. : Manometric Techniques and Tissue Metabolism, 1951, P. 191
8) 山羽力，朝比奈正人：生化学，28, 486 (1956)

Summary

Free sugars, other sugar phosphates and inorganic phosphates contained in some commercial sugar phosphate preparations were determined semiquantitatively by anion exchange chromatography. It was found that some commercial sugar phosphates contained a great amount of impurities.

Received June 18, 1957

インシュリンに関する資料（その4）

日局VI法と米局XV法によるインシュリン注射液定量法の比較検討

長沢佳熊，佐藤　浩，白井浄二

On the Insulin No. VI Comparison of Assay of Insulin Injection with the J. P. VI (U. S. P. XIII) andthe U. S. P. VI method.

Kakuma NAGASAWA, Hiroshi SATŌ and Jōji SHIRAI

まえがき　インシュリン注射液の定量法を18検体について，日局VI法と米局XV法で比較したので，その結果を報告する．

Table 1. Comparison of potency of insulin injection by the use of the J. P. VI (U. S. P. XIII) and the U. S. P. XV method.

Sample No.	J. P. VI method (U. S. P. XIII method) unit/cc	U. S. P. XV method unit/cc	$\frac{1}{2}$L. (Fiducial limits of error %)
1	19.7	19.7	0.086 (81～122)
2	20.6	20.1	0.120 (76～132)
3	19.8	20.2	0.071 (85～118)
4	20.1	19.8	0.074 (85～118)
5	20.1	20.1	0.073 (85～118)
6	20.7	18.4	0.037 (92～108)
7	20.1	19.7	0.098 (80～125)
8	20.2	19.1	0.090 (81～122)
9	19.9	20.9	0.039 (91～113)
10	20.1	20.3	0.054 (88～113)
11	19.9	19.8	0.106 (78～128)
12	20.7	19.3	0.045 (90～110)
13	19.7	19.6	0.048 (89～112)
14	20.6	21.1	0.070 (85～118)
15	20.3	21.3	0.077 (84～120)
16	20.0	19.8	0.047 (90～112)
17	19.7	21.7	0.069 (86～118)
18	19.9	19.7	0.093 (80～123)

前記の成績から統計学的処理を行なつた．

Table 2. The test of significant difference between the mean potencies of insulin injecticn obtained by the J. P. VI and the U. S. P. XV method.

	J. P. (U. S. P. XIII) VI method	U. S. P. XV method
Mean value	$M_1=20.11$	$M_2=20.03$
Standard deviation	$S_1=\sqrt{\frac{1.97}{17}}=0.340$	$S_2=\sqrt{\frac{11.1}{17}}=0.807$
Standard error	$S.e_1=\frac{0.340}{\sqrt{18}}=0.080$	$S.e_2=\frac{0.807}{\sqrt{18}}=0.190$

$$t = S.e_1 - S.e_2 = \sqrt{S.e_1{}^2 + S.e_2{}^2} = \sqrt{(0.080)^2 + (0.190)^2} = 0.206$$

$$\frac{M_1 - M_2}{S.e_1 - S.e_2} = \frac{20.11 - 20.03}{0.206} = 0.39 < 2.03$$ （自由度34のときの t 表からの値〔P=0.95〕）

以上の結果から日局VI法と米局XV法の測定値には有意の差を認めなかつた．

考察とむすび

(1)　日局VI法は家兎を試験前24時間絶食させるため，少なくとも1週間休養させてから第2回目の実験を行うが，米局XV法は絶食させないで，試験前20時間に6時間以内に消化する食餌をあたえ，家兎を常に正常状態にたもち，翌日交叉試験を行うことができるから能率がよい．当所では，通例家兎の食餌を1日2回午前9時と午後3時に与える．試験に際しては当所で行う日局VI法は，試験前日の午前限りで食餌を与えない．米局XV法を行うときは試験当日の午前の食餌のみをあたえていない．

(2)　日局VI法は注射前血糖量をはかり効果を判定しているが，米局XV法は，注射前血糖量を測定しない2-2用量方式を用いて効果を判定している特徴がある．

(3)　日局VI法は注射前および注射後1.5，3，5時間の4回採血を行うが，米局XV法は注射後1，2.5時間の2回であるから能率がよい．

(4)　日局VI法の単位算定の場合グラフで得られた3点を結ぶ際に，結び方により若干の誤差を生ずるが，米局XV法は統計学的に単位，および誤差の信頼限界を算定するから合理的な検定ができる．

以上の考察から米局XV法によるインシュリン注射液の定量法を推奨する．

本報告の日局VI法の定量値は清水製薬株式会社の甲賀喩吉氏の実験によることを記して感謝する．

Summary

We made a comparison of 18 assays of Insulin Injection with the J. P. VI (U. S. P. XIII) and the U. S. P. XV method and obtaind the following results ;

(1)　The procedure of the U. S. P. XV method were more simple and rapid than that of the J. P. VI (U. S. P. XIII) one.

(2)　There were no significant difference of potency of Insulin Injecticn between the J. P. VI (u. s. p. XIII) and U. S. P. XV method.

Received June 18, 1957

インシュリンに関する資料（その1）
インシュリン亜鉛懸濁注射液，結晶性インシュリン亜鉛懸濁注射液および無晶性インシュリン亜鉛懸濁注射液の検定基準について

長沢佳熊，竹中祐典，西崎笹夫
佐藤　浩，白井浄二，岡崎精一

On the Insulin, No. I.
Test Requirements of Insulin Zinc Suspension, Crystalline Insulin Zinc Suspension and Amorphous Insulin Zinc Suspension.

Kakuma NAGASAWA, Yusuke TAKENAKA, Sasao NISHIZAKI,
Hiroshi SATŌ, Joji SHIRAI and Seiichi OKAZAKI

1952年 Hallas-Møller, Petersen, Schlichtkrull[1] はインシュリン結晶に亜鉛を多く含む製品を製し，これがすぐれた持続作用を呈することを発見し，Ultralente Insulin と呼び，無晶形のものを Semilente Insulin, 前者を70%，後者を30%含むものを Lente Insulin と呼んだ．いずれもインシュリンの水性懸濁注射液で，1954年 NNR[2] に，1955年英国薬局方追補[3]（以下英局と略す）に収載された．これらはつぎのような名称で呼ばれるようになり，また作用の持続もつぎのようにいわれている．

英国薬局方の名称		国家検定における名称	注射後の作用時間		
			開始	最高	持続
Ultralente	Insulin Zinc Suspension (Crystalline)	結晶性インシュリン亜鉛懸濁注射液	4～6	24～25	24～30
Lente	Insulin Zinc Suspension	インシュリン亜鉛懸濁注射液	1～2	10～20	約 24
Semilente	Insulin Zinc Suspension (Amorphous)	無晶性インシュリン亜鉛懸濁注射液	1～2	10～12	12～22

これらの内，Ultralente はプロタミン亜鉛インシュリン注射液に，Lente はアイソフェンインシュリン注射液に相当する持続作用を有する．また米国では Lente 製品のみが許可され市販されている．

これらの製品の特長は 1）プロタミンのような異種の蛋白質を含まない持続化インシュリンであること，2）注射後の作用について，3製品を用時適当に混合して，目的とする発顕時間を求めることができること，である．（ただし混合し放置後使つてはならない）．

本品の規格および試験法は，英局追補（1955），FDA規則[4]（以下 FDA と略す）に記されている．筆者等はこれらを参考としてインシュリン亜鉛懸濁注射液（以下〔L〕と略す），結晶性インシュリン亜鉛懸濁注射液（以下〔C〕と略す），および無晶性インシュリン亜鉛懸濁注射液（以下〔A〕と略す）の検定基準を作成したのでここに報告する．なおこれらの基準による国家検定は，昭和32年6月1日から実施されるようになつた．

まず製品のおのおのについての製法の概略を記し，つぎに〔L〕の基準を示し（〔C〕および〔A〕と異なる箇所に下線を付け，それに相当する〔C〕および〔A〕の条文を挙げる），以下〔L〕基準中の（注）に従つて実験例を挙げながら参考事項を述べる．

（以下 u とは単位の略号である）．

製　法

〔C〕単位既知のインシュリンを，塩化亜鉛を含むN/50塩酸（塩化亜鉛濃度は40 u/ccの製品を作る場合はZnとして0.0133 W/V％，80 u/cc の場合は Znとして 0.0266 W/V％である）適量に溶かした液1容に，酢酸ナトリウム5.44 W/V ％および塩化ナトリウム28 W/V％ を含む液 1/3容を加え，水酸化ナトリウムで pHを5.4〜5.5とする．約20時間ふりまぜ結晶を析出させ，この懸濁液に水酸化ナトリウム，塩化亜鉛および適当な防腐剤を含む液を加えて9倍量にする．この液中の水酸化ナトリウムおよび塩化亜鉛の濃度はそれぞれ 40 u/cc の場合は 0.014 W/V％ および0.0077 W/V％（Znとして），80 u/ccの場合は0.017 W/V％ および0.0111 W/V％（Znとして）である．最終製品の pH は約 7.3とする．

〔A〕単位既知のインシュリンを，塩化亜鉛を Zn として0.01W/V％含む N/50塩酸適当量に溶かした液1容に，適当な防腐剤を含む塩化亜鉛溶液（塩化亜鉛濃度は40 u/cc の製品を作る場合は Zn として0.00875 W/V％，80 u/cc の場合は Zn として 0.01375 W/V％ である）8容を加え，更に最終製品が酢酸ナトリウム 0.136 W/V％，塩化ナトリウム 0.7W/V ％および pH 約7.3 となるような量の酢酸ナトリウム，塩化ナトリウムおよび水酸化ナトリウムを含む液1容を加える．

〔L〕上記〔A〕3容と〔C〕7容を混合する．

注　以上製法は英局に従つた．このほかに Novo 社の特許法[5]（結晶インシュリンを pH 7 の塩化亜鉛水溶液中に懸独し，Zn 含量2.3％のインシュリン結晶を製する方法）および Organon 社の特許法[6]（同社の製品 Insulin-Tardum の製法で，この製品は厳密には結晶性インシュリン亜鉛懸独注射液とは異なるも，筆者等の試験では著明な特続作用を家兎の血糖降下力について認めた）もある。

基　準

インシュリン亜鉛懸濁注射液検定基準

本品はインシュリン[注1)]および亜鉛を緩衝液[注2)]中に懸濁した無菌の液で，表示単位の90〜110％[注3)]に対応するインシュリンを含む．本品の懸濁インシュリンのうち約70％は結晶でその他は無晶形である．[注4)]（〔C〕…はほとんどすべて結晶形である．〔A〕…はほとんどすべて無晶形である．）また表示インシュリン100単位量につき Zn(＝65.38) 0.15〜0.30 mg[注5)]を含む．

性 状　本品はほとんど白色の懸濁液である．本品中の懸濁物を鏡検するとき，その過半は単斜晶系の結晶で，その大きさは10〜40μ である．その他の部分は無晶形でその大きさは2μ以下である．（〔C〕…ほとんどすべて結晶でその大きさは 10〜40μ である．〔A〕…ほとんどすべて無晶形で一定の形状を示さない．その大きさはほとんど2μ以下である．）

本品は安定剤として酢酸ナトリウム 0.15〜0.17W/V％，塩化ナトリウム，[注6)] 0.65〜0.75 W/V％ および防腐剤としてパラオキシ安息香酸メチル，パラオキシ安息香酸エチル，パラオキシ安息香酸プロピルまたはパラオキシ安息香酸ブチル[注7)]0.09〜0.11W/V％を含む．

本品の pH は 7.1〜7.5[注8)]である．

確認試験　(1)　本品に塩酸少量を加え，pHを2.5〜3.5とするとき沈澱は溶け，ほとんど無色澄明の液となる．[注9)]

(2)　(1)の澄明な液につき，インシュリン注射液の確認試験(2)を準用する．[注9)]

(3)　本品に塩化第二鉄試液2〜3滴を加えるとき赤褐色を呈しこれに塩酸を加えるとこの色は退色する．[注10)]

(4)　本品につきインシュリン注射液の定量法を準用して試験を行うとき，注射後7時間の血糖量は家兎の過半数において注射前血糖量の85％以下である．ただし注射は本品をそのまま1/100cc の目盛のある注射筒を用いて量り，家兎5匹を用い，その体重2kg につき表示の1.2単位量を注射し採血は注射前および注射後7時間に行い血糖を定量する．[注11)]（〔C〕…注射後9時間，〔A〕には(4)項を記載しない．）

純度試験　(1)　全窒素量　本品を一般試験法第11項のセミミクロケルダール法により窒素を定量するとき，その量は表示の100単位量につき 0.7mg[注12)] 以下でなければならない．

(2)　上澄液中のインシュリン　本品を遠心分離または沪過して得た澄明な液につきインシュリン注射液の定量法を準用するときその含量は表示インシュリン単位の4％以下でなければならない．[注13)]

定量法 (1) インシュリン 本品1ccにつきN/10塩酸0.2ccを加えて澄明とした液についてインシュリン注射液の定量法を準用する．

(2) 亜鉛 グロビン亜鉛インシュリン注射液の定量法(2)を準用する．

(3) 結晶性インシュリン注14)本品の表示600単位量を正確に量り，(〔C〕,〔A〕…400単位量）遠心分離して上澄液を除き，残留物を水5ccに懸濁しアセトン緩衝液10ccを加え3分間ふりまぜた後遠心分離する．上澄液を除き再び同じ操作をくり返す，残留物を稀硫酸に溶かし全量を15ccとする．この液につき一般試験法第11項のセミミクロケルダール法により窒素を定量するとき，全窒素量の55～70％でなければならない．(〔C〕…85％以上，〔A〕…30％以下）

注 アセトン緩衝液： 酢酸ナトリウム8.15gおよび塩化ナトリウム42gを水に溶かし N/10塩酸68cc，アセトン150ccおよび水を加えて500ccとする．

貯法および有効期間 密封容器に入れ1～15°で貯える．有効期間は検定合格の翌月から18ヵ月とする注15)．

製品 通例1cc中40または80単位を含む．

参考事項

注1) インシュリンの全窒素量限度を0.7 mg/100 u以下としたので少くともその純度は21 u/mg程度以上の結晶でなければならない．

注2) 酢酸ナトリウム緩衝液を用いる．この濃度はFDAに準じた．プロタミン亜鉛インシュリン注射液およびアイソフェンインシュリン注射液で用いられている燐酸ナトリウムは本品には使えない．

注3) 従来の持続性インシュリン製剤は85～115％としたが本品には他の蛋白質を加えていないので英局に準じて90～110％とした．（第3表参照）

注4) 製法に述べたように，本品は〔C〕と〔A〕を7：3の割合で混合して調製される．この混合比を適当に変えることにより持続時間を調節できるので臨床上他の製剤にない利点がある．これについて行なつた動物実験例をつぎに示す．（第1表参照）

実験例 1. 混合比と持続時間との関係

体重1.95～2.65 kgの家兎を22時間絶食させておき，その体重2kgに対して1.2単位を注射した．使用した〔C〕,〔A〕は共にNovo (Denmark) 製品である．注射前血糖量を100としたときの注射後血糖量を第1表に示す．なおこの値は1群3匹ずつで行なつた平均値である．

第1表 混合比と持続時間との関係

混合比 〔C〕：〔A〕	注射前血糖値 (mg%)	注射後血糖減少率 (%) 2	3	4	6	9	12 (時間)
1：1	104	57	—	75	84	98	—
3：2	107	49	—	66	70	82	—
7：3＝〔L〕	102	—	63	—	66	80	91
〔C〕	110	—	71	—	63	61	73

7：3の比に混合したものは他の類似製品グロビン亜鉛インシュリン注射液と比較して，はるかに持続時間が長い．

注5) FDAは全亜鉛量を100単位につき0.20～0.25mg，上澄液中にその40～65％を含むと規定している．英局では上澄液中の亜鉛のみを定量し，40 u/cc製品では0.0055 W/V％以下，80 u/cc製品では0.0070 W/V％以下と規定しているが，これを換算するとFDAの上澄液中の範囲(40～65％)にほぼ等しくなつている．この基準では窒素量が多くなつている点，試験法などを考慮していくらか範囲を拡げた．

実験例 2. 全亜鉛量と上澄液中の亜鉛量

NovoおよびLilly社製品についての実験結果を第2表に示す．

第2表

	全亜鉛量	上澄液中の亜鉛量および%	
Novo〔L〕40 u/cc	0.208 mg/100 u	0.12 mg	58.7
Novo〔L〕40 u/cc	0.235 mg/100 u	0.11 mg	46.8
Lilly〔L〕40 u/cc	0.20 mg/100 u	0.13 mg	65

なお，この基準には規定していないが，上澄液中の亜鉛量も規定する必要があると考えられる．

注6） 塩化ナトリウムは他の製剤におけるグリセリンと同じく液を等張にする目的で加える．

注7） 英局には「適当な防腐剤」と記載し特にその品名を示していないが，FDA，NNRにはパラオキシ安息香酸メチルと記載している．この基準はFDAに準じた．

注8） 英局は7.2～7.5，FDA，NNRは7.1～7.5である．

注9） (1)，(2)ともにプロタミン亜鉛インシュリン注射液（国薬），アイソフェンインシュリン注射液（国家検定基準）と同じである．

注10） 緩衝剤である酢酸ナトリウムの呈色反応である．

注11） 持続作用は家兎の個性によりかなり差を生ずることがあるが，通例の家兎についてはこの試験で充分と考えられる．（第3表参照）

注12） FDAは0.65 mg/100 u以下で実験結果（第4表参照）はこれでよいが，一応0.7 mg以下とした．

注13） 英局に準じたが，実験では規定より下廻つた結果を得ている．（第3表参照）

実験例 3. 注3），注11），注13）に関する実験例をまとめて第3表に示す．

第3表

製品＼試験	インシュリン定量値	上澄液中のインシュリン	持続作用
Novo〔L〕40 u/cc	98%	4%以下	5匹中3匹（81，77，82%）適
Lilly〔L〕40 u/cc	103%	血糖量にほとんど変化がない	5匹中4匹（79,83,75,85%）適

注14） アセトン緩衝液によつて無晶性インシュリンは抽出され，残留した結晶性インシュリンの窒素量を定量することにより，混合比を知るのである．この基準では一般試験法第11項のセミミクロケルダール法を用いて窒素を定量するため，英局やFDAの方法をいくらか変えた．〔A〕については英局に記載されていないが，これら3種を明確に区別するためこの基準には加えた．これについての実験例を第4表に示す．ただし遠心分離の操作中，回転数および回転時間を，それぞれ3000回転，5分間（半径13cm）で行つた．この条件は一定にする必要があると考える．また〔A〕については更に検討中である．

第4表 全窒素量および結晶性インシュリンに関する実験例

製品別		全窒素量（mg/100 u）	結晶性インシュリン	
			残留物の窒素(mg/100u)	%
Novo	〔L〕40 u/cc	0.470	0.319	68
Novo	〔L〕40 u/cc	0.584	0.379	64.4
Novo	〔C〕40 u/cc	0.466	0.431	92.5
Novo	〔A〕40 u/cc	0.411	0.107	26
Lilly	〔L〕40 u/cc	0.235	0.132	56
Toronto	〔L〕80 u/cc	0.414	0.232	56

注15） 英局では凍結を避け，なるべく低温で貯える．その温度が20°に近いと効力は減退する．有効期間は製

造年月日より2年間となつているが，プロタミン亜鉛インシュリン注射液（国薬）に準じた．

文　献

1) Hallas-Møller. K., Petersen. K., and Schlichtkrull. J. : *Science*, 116, 394 (1952).
2) NNR : 463 (1955), 395 (1956), 430 (1957).
3) British Pharmacopoeia1953 : Addendum, (1955) ; 34~40.
4) Food and Drug Administration : 144 · 14~15, July, (1954).
5) Novo Terapeutisk Laboratorium : Brit. Patent. 711, 276 C. A. 49, 572 (1955)
6) J. D. H. Homan, J. Jens (to Organon, Inc.) : U. S. Patent. 2, 787, 575, C. A. 51, 9099 (1957)

Summary

Tests and Standards for the national assay of Insulin Zinc Suspension, Crystalline Insulin Zinc Suspension and Amorphous Insulin Zinc Suspension were proposed by the authors in reference to the British Pharmacopoeia Addendum 1955 and the regulations of the Food and Drug Administration.

Received June 18, 1957

インシュリンに関する資料（その2）
日局インシュリン標準品（1955）の力価検定

長沢佳熊，佐藤　浩，白井浄二

On the Insulin No. II.
On the Assay of the Japanese Pharmacopoeia Insulin Standard (1955).

Kakuma NAGASAWA, Hiroshi SATŌ and Jōji SHIRAI

まえがき　Connaught Laboratories, Toronto 製結晶インシュリンを，日局インシュリン標準品（1955）とするために，国際標準品（1952）および日局標準品（1954）と比較してその力価を検定したので，その成績について報告する.

実験方法

1）検定法　この報告では米局XV[1]記載の（2-2）用量方式による交叉試験法を用いた．ただし血糖測定は日局VI[2]法に準拠した.

2）標準液および検液の調製法　標準品，検体共に日局VI記載の溶剤を用いて溶かし，標準品は1cc中20単位を含むように調製して標準原液とし，検体は表記単位に従つて1mg中23.6単位を含むものとみなし，1cc中20単位を含むように調製して検体原液とした．この両原液を実験当日更に前記溶剤を用いて適当な濃度に稀釈して注射した．高用量と低用量との比は2：1とし，注射用量はすべて0.5ccとした.

3）実験動物　体重1.8～2.6kgの健康な家兎24匹を用い，実験当日は実験終了後まで飼料を与えない.

4）採血時間その他　注射後1時間および2時間半の2回採血する．第2回の試験は第1回試験を行なつた日の翌日に実施した．採血量および血糖測定などはすべて日局VIと同様に行なつた.

実験結果

前記の実験条件に従つて行なつた実験の結果を Table 1, 2, 3に示す．なお Table 中 SH および SL はそれぞれ標準液の高用量および低用量を，TH および TL はそれぞれ検液の高用量および低用量を示す.

Table 1.　2 and 2 Dose Assay of Insulin.　(Exp. 1)

Group	Rabbit No.	Response 1st Day		Response 2nd Day		y (H−L)	Ti
1	1	SH	72	TL	119	−47	−205=T_1
	2		105		121	−16	
	3		142		170	−28	
	4		121		174	−53	
	5		124		155	−31	
	6		121		151	−30	
2	7	SL	134	TH	128	− 6	−125=T_2
	8		95		77	−18	
	9		119		98	−21	
	10		129		98	−31	
	11		140		118	−22	
	12		101		74	−27	

Group	Rabbit No.		Response 1st Day		Response 2nd Day	y (H−L)	Ti
3	13	TH	117	SL	156	−39	$-170=T_3$
	14		135		156	−21	
	15		145		159	−14	
	16		110		164	−54	
	17		134		155	−21	
	18		120		141	−21	
4	19	TL	145	SH	128	−17	$-92=T_4$
	20		131		115	−16	
	21		153		130	−23	
	22		134		126	− 8	
	23		148		128	−20	
	24		131		123	− 8	

SH… 2 u/cc ; SL… 1 u/cc ; TH…0. 0847 mg/cc ; TL…0. 0424 mg/cc

M′= −0. 0010 ; Potency=23. 55 Units.

L = 2 ×0. 0602

Fiducial limits of error=87. 0～114. 9%

Table 2. 2 and 2 Dose Assay of Insulin. (Exp. 2)

Group	Rabbit No.		Response 1st Day		Response 2nd Day	y (H−L)	Ti
1	1	SH	86	TL	157	−71	$-345=T_1$
	2		111		193	−82	
	3		134		184	−50	
	4		124		203	−79	
	5		143		172	−29	
	6		105		139	−34	
2	7	SL	127	TH	117	−10	$-150=T_2$
	8		116		84	−32	
	9		120		85	−35	
	10		141		116	−25	
	11		143		127	−16	
	12		90		58	−32	
3	13	TH	107	SL	150	−43	$-270=T_3$
	14		136		171	−35	
	15		148		168	−20	
	16		125		191	−66	
	17		102		177	−75	
	18		128		159	−31	
4	19	TL	138	SH	127	−11	$-98=T_4$
	20		127		125	− 2	
	21		163		138	−25	
	22		101		65	−36	
	23		142		131	−11	
	24		131		118	−13	

SH…1. 8 u/cc ; SL…0. 9 u/cc ; TH…0. 0763 mg/cc ; TL…0. 0382 mg/cc ;

M′=−0. 0080 ; Potency=23. 17 Units

L = 2 ×0. 0639

Fiducial limits of error=86. 2～115. 7%

Table 3. 2 and 2 Dose Assay of Insulin. (Exp. 3)

Group	Rabbit No.	Response	1st Day		2nd Day	y (H−L)	Ti
1	26	SH	101	TL	143	−42	−298 = T_1
	25		96		121	−25	
	27		102		122	−20	
	28		163		219	−56	
	29		83		186	−103	
	30		103		155	−52	
2	31	SL	174	TH	145	−29	−188 = T_2
	32		169		115	−54	
	33		143		117	−26	
	34		163		145	−18	
	35		135		101	−34	
	36		128		101	−27	
3	37	TH	146	SL	207	−61	−333 = T_3
	38		143		190	−47	
	39		129		185	−56	
	40		86		133	−47	
	41		112		174	−62	
	42		102		162	−60	
4	43	TL	157	SH	109	−48	−195 = T_4
	44		171		149	−22	
	45		163		118	−45	
	46		133		104	−29	
	47		160		134	−26	
	48		159		134	−25	

SH… 2 u/cc ; SL… 1 u/cc ; TH…0. 0847 mg/cc ; TL…0. 0424 mg/cc ;

M′=0. 0083 ; Potency=24. 05 Units ;

L = 2 ×0. 0530

Fiducial limits of error=88. 6〜113. 1%

以上のごとくにして得た力価について重みを加えた平均値を求めると 1 mg 当り 23. 64 単位となつた．これを Table 4 に示す．

Table 4. The Weighted Mean of the Potency of the Insulin Sample by the Three Assays.

Exp. No.	M	w	wM
1	−0. 0010	1 200. 28	−1. 20028
2	−0. 0080	1 067. 73	−8. 54184
3	0. 0083	1 548. 81	12. 85512
Total		3 816. 82	3. 11300

$\bar{M}$=0. 0008 ; $\bar{R}$=1. 002 ; Potency=23. 64 Units

むすび Toronto 製結晶インシュリンを検定した結果，これを日局標準品（1955）と認めた．その力価は 1 mg 当り 23. 6 日局単位（=23. 6 国際単位）である．

文献

1) 米局XV；339, 878, 879.
2) 日局VI；59.
3) Drug Standards, 24, No. 2, 64 (1956).

Summary

The potency of crystalline insulin from the Connaught Medical Research Laboratories, Toronto was determined by the U. S. P. XV[1] method, comparing its response with that of the International Standard (1952) and of the Japanese Pharmacopoeia Standard (1954).

From the result of the assays, we found that the sample preparation contains 23.6 international units per mg. This preparation was accepted by our Laboratories as a Japanese Pharmacopoeia Insulin Standard (1955), having a potency of the same number 23.6 of J. P. units.

Received June 18, 1957

インシュリンに関する資料（その3）
国家検定に合格したインシュリン製剤の年間量の統計

長沢佳熊，佐藤　浩，白井浄二

On the Insulin, No. III.
The Total Amount of Annual Comsumption of Commercial Insulin Injections in Japan.

Kakuma NAGASAWA, Hiroshi SATŌ and Jōji SHIRAI

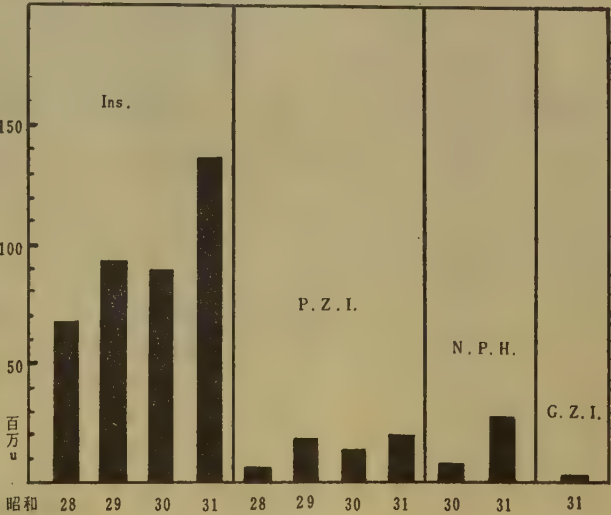
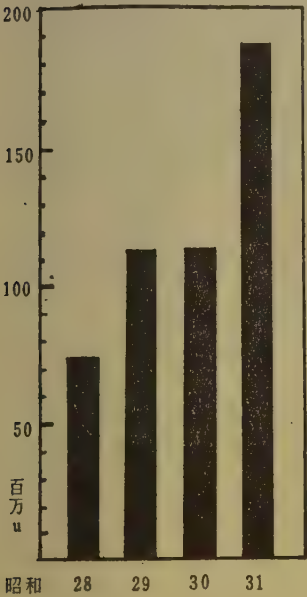
昭和26年10月からインシュリン注射液〔Ins. と略す〕およびプロタミン．亜鉛．インシュリン注射液〔P.Z.I. と略す〕の国家検定が実施されることになり，昭和30年8月にはアイソフェンインシュリン注射液〔N.P.H. と略す〕およびグロビン亜鉛インシュリン注射液〔G.Z.I. と略す〕，昭和32年6月にはイシュリン亜鉛懸濁注射液，結晶性インシュリン亜鉛懸濁注射液および無晶性インシュリン亜鉛懸濁注射液も，これに加えられた．つぎに昭和28年から31年までの国家検定合格数量を集計した．（ただし，年間集計は1月より12月末までに受付けた国産および輸入製品で，不合格品は含まない．）インシュリンの需要量については，従来しばしば問題となつたが，ここに得た数量が我が国の需要量または消費量を示すものと考えられよう．この資料から近年消費量は著しく増大していることがわかる（第1表，第1図および第2図参照）．

第1表　国家検定に合格したインシュリン製品量（数字は1 000単位量を示す）

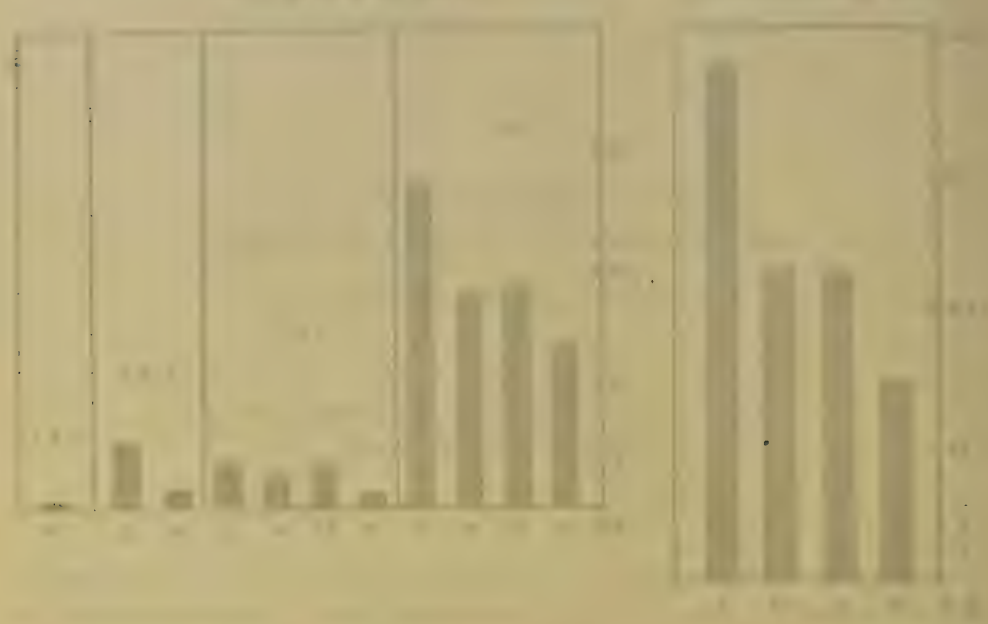
	28	29	30	31
Ins.	67 453.1 (1 230.4)	92 103.7 —	87 938.0 (117.2)	134 980.8 —
P.Z.I.	5 740.0 (840.0)	18 500.0 —	15 335.5 (157.2)	19 000.0 —
N.P.H.			8 175.2* (6 175.2)	28 055.2 (13 514.8)
G.Z.I.			0** —	3 145.0 —
合　　計	73 193.1 (1 070.4)	110 603.7 —	111 448.7 (6 449.6)	185 181.0 (13 514.8)

註：（　）内は，その内の輸入製品量である．
*　8月より12月末までの集計である．
**　2検体あつたが不合格であつた．

第1図　製剤総合計の統計図

第2図　製剤別統計図

Summary

The histogram of the annua. amount of commercial insulin injections passed by the National Assay carried out in our laboratory, from 1953 to 1956, is shown. This histogram could be suggested that the annual comsumption of insulin in Japan is remarkably increasing.

Received June 18, 1957

輸入あへんについて

朝比奈晴世，志内賢彦

Assay of Imported Opium.

Haruyo Asahina and Yoshihiko Shiuchi

まえがき　製薬原料としてのあへんは，昭和29年以降31年までにトルコから5回，イラン，インドから1回ずつ輸入されている．

これら三国はあへんの主要な生産国であり，それぞれの政府を通じて合法的に輸出されているあへんについて，その性質を知ることは現在国際連合で企図しているあへんの産地鑑別の研究上必要なことである．これらのあへんについて水分，灰分，モルヒネおよびコデインの定量を行つた．

一方これらの諸国は商取引上，モルヒネ含量をイギリスの Harrison & Self Laboratory の分析値で保証しているのでこの値とも比較してみた．

次の表は輸入状況の明細と輸入業者を経て入手したHarrison & Self Laboratory の分析結果である．

Data of Impoted Opium

No.	Import			Harrison & Self		
	Date	Country	Amount	Date	Morphine	Moisture
1	22 Aug. 1954	Turkey	16,000,000g	6 Aug. 1954	12.94%	16.8%
					12.96	16.9
					13.00	16.4
					12.98	16.8
2	23 Mar. 1955	Turkey	947,815	14 Jan. 1955	14.18	13.1
3	19 Sep. 1955	Turkey A	16,000,000	20 Aug. 1955	14.30	13.9
		B			14.30	13.8
		C			14.29	14.2
		D			14.32	14.3
4	2 Mar. 1956	Turkey A	8,485,982	23 Dec. 1955	14.92	13.4
		B			15.03	13.3
		C			14.98	13.5
5	14 Jun. 1956	Turkey A	20,000,000	5 Jun. 1956	12.89	19.1
		B			12.81	18.0
		C			12.87	18.2
		D			12.83	19.3
		E			12.95	19.3
6	5 Sep. 1956	Iran	5,002,500	24 Aug. 1956	10.26	8.7
7	6 Oct. 1956	India	5,000,000	27 Sep. 1956	11.34	

なおHarrison & Self Laboratoryは同所で行つているモルヒネの定量法に関しては方法を発表していない.

実験の部

実験材料

トルコ，イラン，インドから輸入され現地で密封，封印されたあへん.

実験方法

(1) モルヒネ定量　i) 日局 Ⅵ，ii) 英局 (1953)，iii) 衛試，72,57 (1954) の方法

(2) コデイン定量　衛試，72,57 (1954) の方法

(3) 水分　国際薬局方[1]，国際連盟[2] の方法

(4) 灰分　日局 Ⅵ，生薬の灰分試験法

実験結果

第1表は分析値を示す.

Table 1. Data of Assay

No.	Country		Morphine			Codeine	Moisture	Ash
			i)	ii)	iii)			
1	Turkey		12.44%	13.06%	12.90%	1.57%	9.62%	3.74%
2	Turkey		12.97	14.00	13.59	1.20	13.06	3.11
3	Turkey	A	12.62	13.94	13.67	1.15	14.67	4.38
		B	12.76	13.88	13.13	1.12	14.61	3.15
		C	12.52	13.95	13.08	1.15	14.32	3.04
		D	12.65	13.95	13.08	1.12	14.60	3.48
4	Turkey	A	13.03	14.44	12.65	1.03	14.06	3.08
		B	12.94	14.36	12.61	0.88	14.02	3.51
		C	12.91	14.40	12.61	0.95	13.96	3.66
5	Turkey	A	11.58	12.23	11.91	1.15	19.30	3.29
		B	11.58	12.21	11.74	1.15	19.42	3.06
		C	11.61	12.11	11.82	1.22	19.85	3.04
		D	11.64	12.09	12.07	1.23	19.70	3.06
		E	11.61	12.23	11.71	1.12	19.92	2.86
6	Iran		10.05	10.81	10.80	3.10	9.45	2.36
7	India		12.20	11.41	13.75	2.53	10.90	1.87

第2表はHarrison & Self Laboratoryの分析値とわれわれの分析値との差を示す.

A. Harrison & Self Laboratoryと　i) との差

B. Harrison & Self Laboratoryと　ii) との差

C. Harrison & Self Laboratoryと　iii) との差

Table 2.　Discrepancy of Morphine Values

No.			A	B	C
1	Turkey		0.50%	0.88%	0.04%
2	Turkey		1.21	0.18	0.59
3	Turkey	A	1.68	0.36	0.63
		B	1.54	0.42	1.17
		C	1.77	0.34	1.21
		D	1.67	0.37	1.24
4	Turkey	A	1.89	0.48	2.27
		B	2.09	0.67	2.42
		C	2.07	0.58	2.37
5	Turkey	A	1.31	0.66	0.98
		B	1.23	0.60	1.07
		C	1.26	0.76	1.05
		D	1.19	0.74	0.76
		E	1.34	0.72	1.24
6	Iran		0.21	−0.55	−0.54
7	India		−0.86	−0.07	−2.41

トルコ産は 1，2，3，4，5いずれも，Harrison の方が高い値を示し特に4では著しい．
イラン産，インド産はイラン産の日局の場合を除き Harrison の方が低くなつている．
第3表はコデイン定量値と日局　VIによるモルヒネ定量値との比率である．

Table 3.　Ratio of Codeine and Morphine

No.				No.			
No. 1	Turkey		1.26	4	Turkey	C	0.73
2	Turkey		0.92	5	Turkey	A	0.99
3	Turkey	A	0.91			B	0.99
		B	0.87			C	1.05
		C	0.91			D	1.05
		D	0.88			E	0.96
4	Turkey	A	0.78	6	Iran		3.08
		B	0.68	7	India		2.08

考 察　コデインとモルヒネとの比率はトルコ産は他に比較して低く，14検体のうち11は1以下でイラン産，インド産は比較的高い．すなわちトルコ産に比してモルヒネ含量の割合にコデイン含量が多い．これは先に報告[3]した国際連合より寄贈されたあへん中のインド産あへんにおいてもみられたことである．

むすび　輸入されたトルコ，イラン，インド産のあへんについて，モルヒネ，コデイン，水分，灰分の定量を行い，モルヒネについては Harrison & Self Laboratory の値と比較した．

コデインとモルヒネの割合はトルコ産はモルヒネは多いがコデインは少なく，イラン，インド産はモルヒネにたいしてコデインの割合が大きい．

なお輸入状況の明細は厚生省麻薬課，Harrison & Self Laboratory の分析値はあへん輸入業者である第一物産株式会社，東洋棉花株式会社，丸紅飯田株式会社から得たので謝意を表する．

文献

1) *International Pharmacopoeia First edition* Vol. 1, 162.
2) *Bulletin of the Health Organisation of the Leaque of Nations.* Vol. VII Extract No. 6, 10 (1938).
3) 朝比奈晴世，志内賢彦：衛試，73，67 (1955).

Summary

We have determined the contents of morphine, codeine, moisture and ash in the opium samples imported for drug manufacture from Turkey, Iran, and India.

As to the morphine content, we have compared the value given by Harrison & Self Laboratory in London to those obtained by us according to the methods of J. P. VI, B. P. and our benzene shaking procedure.

It is demonstrated that the proportion of morphine and codeine in opium may be indicative of its origin.

Received June 18, 1957

昭和31年度日本産あへんのモルヒネ含量について

中川雄三, 伊阪　博, 今井雅子
東谷芳子, 藤原英子, 南　博允
中村好孝,

Morphine Content of Japanese Opiums Produced During 1955～1956.

Yūzō NAKAGAWA, Hiroshi ISAKA, Masako IMAI,
Yoshiko TŌTANI, Eiko FUJIWARA, Hironobu MINAMI,
and Yoshitaka NAKAMURA

まえがき　あへん法第32条により昭和31年度に収納されたあへん1,391検体のモルヒネ含量について報告する.

実験の部

実験材料　長野・愛知・大阪・和歌山・兵庫・岡山・広島の一府六県で生産されるあへんである.

モルヒネの定量法　日本薬局方VI「あへん末定量法」を応用した.

試験成績　昭和31年度収納あへんのモルヒネ含量は Table I の通りである.

Table. I. Morphine Content of Japanese Opium Produced During 1955～56.

府県名	場所	検体数	平均モルヒネ含量 %	モルヒネ含量 最低 %	モルヒネ含量 最高 %
長野	更級郡	17	11.46	8.92	15.11
	埴科郡	18	12.65	7.32	18.98
	小県郡	9	13.25	9.97	18.28
	小計	44	12.45	7.32	18.98
愛知	渥美郡	155	14.99	8.12	19.68
大阪	茨木市	108	14.37	9.16	17.97
	高槻市	36	14.97	10.77	17.60
	三島郡	58	14.31	10.37	18.34
	小計	202	14.55	9.16	18.34
和歌山	有田郡	806	12.06	5.71	18.01
	日高郡	97	12.74	10.16	16.32
	小計	903	12.45	5.71	18.01
兵庫	宍粟郡	23	11.96	9.98	15.55
岡山	岡山市	5	11.07	9.97	10.72
	英田郡	17	13.55	7.41	15.70
	小計	22	12.31	7.41	15.70
広島	府中市	16	13.57	11.13	14.90
	芦品郡	15	13.45	11.12	15.91
	加茂郡	3	11.08	10.23	11.40
	佐伯郡	2	13.96	11.21	16.30
	御調郡	6	14.17	11.12	17.38
	小計	42	13.25	10.23	17.38
総計		1,391	13.14	5.71	19.68

各府県別収納あへんのモルヒネ含量と検体数との関係は Table II の通りである.

Table Ⅱ. Classification of Opiums from All the producing provinces According to Morphine Content.

府県名	場所＼含量	6%以下	6%	7%	8%	9%	10%	11%	12%	13%	14%	15%	16%	17%	18%	19%	計
長野	更級郡	—	—	—	1	2	4	3	1	1	2	3					17
	埴科郡	—	—	1	2	—	1	3	3	1	1	1	3	—	2	—	18
	小県郡	—	—	—	—	1	1	—	2	1	—	2	1	—	1	—	9
	小計	—	—	1	3	3	6	6	6	3	3	6	4	—	3	—	44
愛知	渥美郡	—	—	—	1	4	3	9	13	19	23	26	29	17	10	1	155
大阪	茨木市	—	—	—	—	3	5	7	6	14	26	22	19	6	—	—	108
	高槻市	—	—	—	—	—	1	—	—	4	12	9	8	2	—	—	36
	三島郡	—	—	—	—	—	2	4	4	13	14	13	6	—	2	—	58
	小計	—	—	—	—	3	8	11	10	31	52	44	33	8	2	—	202
和歌山	有田郡	1	1	1	4	19	97	205	233	152	68	17	6	1	1	—	806
	日高郡	—	—	8	18	21	17	21	10	2	—	—	—	—	—	—	97
	小計	1	1	9	22	40	114	226	243	154	68	17	6	1	1	—	903
兵庫	○○郡	—	—	—	—	1	6	8	4	—	3	1	—	—	—	—	23
岡山	岡山市	—	—	—	—	1	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5
	英田郡	—	—	1	—	—	1	2	5	2	4	2	—	—	—	—	17
	小計	—	—	1	—	1	5	2	5	2	4	2	—	—	—	—	22
広島	府中市	—	—	—	—	—	—	2	5	3	6	—	—	—	—	—	16
	芦品郡	—	—	—	—	—	—	3	3	5	3	1	—	—	—	—	15
	加茂郡	—	—	—	—	—	2	1	—	—	—	—	—	—	—	—	3
	佐伯郡	—	—	—	—	—	—	1	—	—	—	—	1	—	—	—	2
	御調郡	—	—	—	—	—	—	1	2	1	—	—	1	1	—	—	6
	小計	—	—	—	—	—	2	8	10	9	9	1	2	1	—	—	42
総計		1	1	11	26	52	144	270	291	218	162	97	74	27	16	1	1,391

表に示す如く県別平均モルヒネ含量は愛知・大阪・広島・和歌山・長野・岡山及び兵庫の順に低く，地区別に見れば愛知渥美郡が最も高く大阪高槻市がこれに次いだ．

考　　察

昭和31年度収納あへん 1,391 検体についてモルヒネ含量試験を行なつたところ最高 19.68%，最低 5.71%，平均値 13.14% であつた．

モルヒネ含量	検体数
15～19%	215
10～14%	1,085
7～9 %	89
6%以下	2

昭和30年度収納あへんでは和歌山・長野産のもののモルヒネ含量が高かつたのに較べて昭和31年度収納あへんでは愛知・大阪産のものが和歌山産のものよりもモルヒネ含量の高かつたのは和歌山では，けしの採汁時期が愛知・大阪地区より1～2週間早く，採汁回数も四番切りまで完了し，従つて反別収量も前年と同様であるが愛知大阪では梅雨季にかかり，あへんの採汁作業も殆んど一番切乃至二番切どまりで三番，四番切のものは，雨に流

されモルヒネ含量の高い濃厚汁液のみを採収した結果になつたためと思われる．従つて大阪・愛知両県共にその反別収量は前年の約半分であつた．

以上の理由により実際には平均モルヒネ含量が12.45％で全体の80％が10～13％のモルヒネを含んでいる和歌山産あへんが最も品質良好と思われる．

Summary

We have determined the mophine content in Japanese Opiums produced by Poppy Cultivators during 1955～1956 in seven provinces of NAGANO, AICHI, OSAKA, WAKAYAMA, HYOGO, OKAYAMA and HIROSHIMA. Morphine percentage obtained thus fat are as follows.

Total number of sample	1,391
below 6%	2
7～9%	89
10～14%	1,085
above 15%	215

Received June 18, 1957

ビタミン標準品に関する資料 II.
ビタミンB_1, B_2, B_6, C, パラアミノベンゾイルグルタミン酸及びB_1液の製造とその品質について

広瀬朝次

Preparation and Critical Analytical Data of Reference Standards of Vitamins II.
Vitamins B_1, B_2, B_6, C, Para -aminobenzoyl-glutamic Acid and B_1 Solution.

Asaji Hirose

まえがき　さきにニコチン酸，ニコチン酸アミド及びK_3の試製について報告[1]したが，その後著者はビタミンB_1，B_1液，B_2，B_6，C，パラアミノベンゾイルグルタミン酸標準品について検討を加え，その結果標準品として販布されることになつたので報告する．パラアミノベンゾイルグルタミン酸は葉酸定量の標準品であるが，英米薬局方が採用しているのはパラアミノ安息香酸であるからそれとの比較をも行なつた．

I. 試験法

試験法は前報同様現行米国薬局方標準品の分析成績* 及び日本，英国，米国，国際並びに独国の薬局方を参照して定めた．但しB_1液標準品は他の薬局方にはないものである．

葉酸定量のための標準品として米，英はパラアミノ安息香酸を，国際薬局方は我が国同様パラアミノベンゾイルグルタミン酸を用いている．

1. 米国薬局方標準品の分析成績

(イ) ビタミンB_1

外観：白色結晶，かすかに特異の臭を有する．

溶状：20%水溶液は無色澄明で pH3.35

融点以下各項目の分析成績は Table 3 を見よ

(ロ) ビタミンB_2

外観：黄色〜橙黄色の結晶性粉末

溶解性：N/50 酢酸に約 70°C で 30分以内に 1 cc 当り100γ 溶解する．

融点以下各項目の分析成績は Table 4 を見よ

(ハ) ビタミンB_6

外観：白色無臭の結晶

溶状：20%水溶液は無色澄明，5%水溶液の pH は 2.75

融点以下各項目の分析成績は Table 5 B にまとめて示した．

(ニ) ビタミンC

外観：白色結晶又は結晶粉末

融点以下各項目の分析成績は Table 6 を見よ．

(ホ) パラアミノ安息香酸

外観：かすかに褐色の針状結晶

溶状：5%アルコール溶液はかすかに黄色，澄明．

融点以下各項目の分析成績は Table 7 に示した．

---

* U. S. P. Reference Standards, 46 Park Arenue, New York.

2. 日，英，米，国際及び独薬局方に掲げる試験項目（Table 1）または恕限量
十印は当該項目に対する規格に合うことを示す．

Table (a) Specifications for Vitamin B_1 Preparations.

Specifications \ Pharmacopoeia	J. P.[2]	I. P.[3]	U. S. P.[4]	B. P.[5]
Description	+	+	+	+
Solubility	+	+	+	+
Melting range	—	—	248°	—
Picrate	+	+	+	+
Chloride	+	+	+	+
Sulfate	+	+	+	+
Solution	+	+	+	—
Loss on drying (%)	5	5	5	3～5.1
Residue on ignition (%)	0.2	0.2	0.2	0.2
Assay (%) HCl	94.6～101.3	94.6～103.0	—	—
	—	98*	98*	98**

* fluorometry ** B. P. method (silicotungstic acid)

Table 1. (b) Specifications for Vitamin B_2 preparations.

Specifications \ Pharmacopoeia	J. P.[2]	I. P.[3]	U. S. P.[4]	B. P.[5]
Description	+	+	+	+
Sulubility	+	+	+	+
Melting range (°C)	about 280	281～285	about 280	about 280
Specific rotation	−112～−122°	−110～−130°	−112～−122°	−110～−130°
Loss on drying (%)	1.5	1.5	1.5	1.5
Residue on ignition (%)	0.3	0.5	0.3	0.5
Lumiflavin test	+	+	+	+
Nitrogen (%)	14.5～15.2	14.5～15.2	—	14.5～15.2
Fluorometry (%)	—	—	98	—

Table 1. (c) Specifications for Vitamin C Preparations.

Specifications \ Pharmacopoeia	J. P.[2]	I. P.[3]	U. S. P.[4]	B. P.[5]
Description	+	+	+	+
Solubility	+	+	+	+
Residue on ignition (%)	0.1	0.1	0.1	—
Heavy metals (p. p. m.)	20	20	20	—
Loss on drying (%)	—	0.4	—	—
Assay (%)	99	98	99	98

Table 1. (d) Specification for Vitamin B_6 Preparations.

Specifications \ Formulae	J. N. F.[6]	U. S. P.[4]	D. A. B.[7]
Description	+	+	+
Solubility	+	+	+
Melting range (°C)	204～208	204～208	204～207
Loss on drying (%)	0.8	0.5	—
Residue on ignition (%)	0.1	0.1	0.25
Ammonium Salt	—	—	+
Sulfate	—	—	+
Heavy metals	+	+	+
Assay : Colorimetry (%)	98	—	—
N-Content	—	96.9～101.3	—
Cl-Content	—	98.2～102.3	97.3～100.5

Table 1. (e) Specifications for Para-aminobenzoic Acid Preparations.

Specifications	J. N. F.[6]	N. F.[8]	B. P.[5] (reagent)
Description	+	+	+
Solubility	+	+	+
Melting range (°C)	186～189	186～189	186～189
Loss on drying (%)	0.2	0.2	—
Residue on ignition (%)	0.1	0.1	0.2
Heavy metals	+	+	—
Assay (%)	98.5①	98.5①	98.5②

① Diazometry
② Acidometry

3. 他に適当な規格のない場合

(イ) パラアミノベンゾイルグルタミン酸

Table 1 (e)を参照して次の如く定めた.

外観：微に黄色の結晶性粉末

溶状：0.5%アルコール溶液は無色澄明

融点：172.5±2°C

乾燥減量：硫酸デシケータ（減圧）で4時間乾燥した時約0.05%

灰分：約0.02%

定量　diazotization　:　99%以上

azotometry　:　99.5%以上

$E^{1\%}_{1cm}$ at 273mμ (N/10NaOH)　:　約605

colorimetry　:　100%*

*この方法は将来は標準品と比較により決める．今回は参考程度にパラアミノ安息香酸と比較を行なつた．（分子量比で換算して）

(ロ) ビタミンB_1 液の規格

標示量に対して99.5～101.0%でなければならない.

定量法

ホルマリンアゾ法

紫外部吸収スペクトル法：pH 約3の稀塩酸水で 246mμ における吸光度を測定する.

いずれの場合も標準結晶を標準に用いる.

Ⅲ. 本研究における試験項目及び試験法

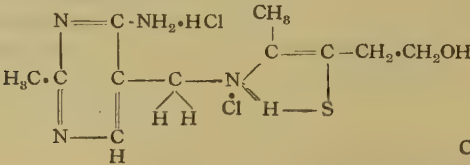
結晶についてはⅡを参照して次の如く定めた.（Table 2）但しパラアミノベンゾイルグルタミン酸の規格は上述の通りで，方法のみ下表に入れる，なおB_1液についてはB_1結晶の Assay の項のみ行う.

Table 2. Analyses applied to Present Preparations.

	Vitamin B_1	Vitamin B_2	Vitamin B_6	Vitamin C	Para-aminobenzoyl-glutamic Acid
Description	J. P.	J. P.	J. N. F.	J. P.	—
Solubility	J. P.	J. P.	J. N. F.	J. P.	—
Melting range	—	J. P. with standard thermometer	J. N. F. with standard thermometer	—	(with standard thermometer)
Loss on drying	J. P., 105° for 2 hrs.	see left	over H_2SO_4 for 4 hrs. (vacuum)	—	orer H_2SO_4 for 4 hrs. (vacuum)
Residue on ignition	J. P.	J. P.	J. N. F.	J. P.	(Sulfated)
Heavy metals	J. P.	—	J. N. F.	J. P.	—
Nitrogen	Dumas method	see left	see left	—	Dumas method
Assay	J. P. plus Colorimetry, Spectrophotometry	J. P. plus Colorimetry, Fluorometry, Azotometry	J. N. F., Azotometry and U. S. P.	J. P.	Diazotation, Azotometry and Colorimetry

Ⅳ. 製造並びに試験成績

1. ビタミンB_1（塩酸チアミン）

$C_{12}H_{17}ON_4ClS \cdot HCl = 337.28$

注射液用のB_1結晶を精製し純品としたものである.

現標準品と米国薬局方標準品の分析成績を比較すれば次の如くである.

Table 3. Critical Analytical Data on Present Vitamin B_1 Standards.

Specifications \ Standards	J. P.	U. S. P.
Description	good	good
Solution in water (lim 5)	clear	clear
pH of solution (1%)	about 3.18	about 3.35
Loss on drying (%)	0.8	0.2

Specifications \ Standards	J. P.	U. S. P.
Residue on ignition	0.01	0.0
Nitrogen (%) (theory : 16.6)	16.45	16.43
Sulfate	None	None
Assay (%) for HCl	99.9	99.7
: Colorimetry	100.3	100.0
: Spectrophotometry	100.2	100.0

2. ビタミンB_1液

B_1を正確に2 cc 中1 mg 含有するN/1000 塩酸水溶液である．原料は標準結晶を用い，注射剤と同様に滅菌した2 ccアンプル入りである．1年以上経過したものは含量の低下を来すので有効期間は1年間とした．

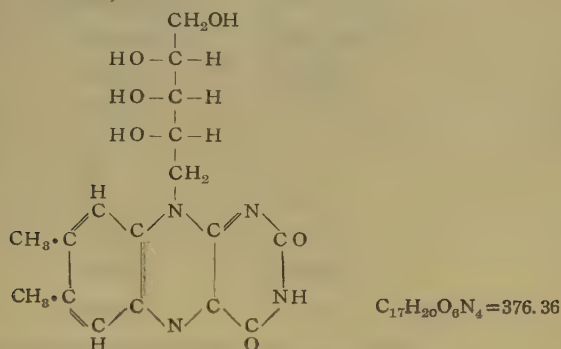
最近の液標準品に関するDataを略記する．

31年度6月製及び10月製のB_1液の pH はいずれも3.1で無色澄明である．ホルマリンアゾ法及び紫外部吸光度法（at 246mμ）では前者は 100.5%，100.6%，後者は 100.7%及び 101.0%であつた．

期限切れのものは廃棄処分にしているが，冷蔵保存では殆んど変化なく，2年間の室温保存で約0.5%の低下を示した．

3. ビタミンB_2（リボフラビン）

```
              CH2OH
               |
          HO - C - H
               |
          HO - C - H
               |
          HO - C - H
               |
              CH2
      H        |
       C       N       N
     //  \   /   \   //  \
CH3・C     C        C       CO
     |     |        |       |
CH3・C     C        C       NH
      \\  / \     /  \    /
        C     N        C
        H              O
```

$C_{17}H_{20}O_6N_4=376.36$

水に対する溶解度が結晶形により異り融点も異るものがある．比較的溶解性がよく，しかも純度の高い標準結晶を稀酢酸を用いての精製法により得た．やや目的に近いものであるが，U. S. P. 標準品の方が溶解性についてはなおすぐれているようである．

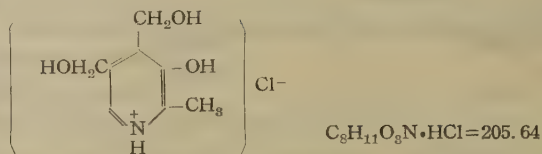
従来の標準品の分析成績と米国薬局方標準品の分析成績を比較すれば次の如くである．（Table 4）

Table 4. Critical Analytical Data on Present Vitamin B_2 Standards.

Specifications \ Standards	J. P.	U. S. P.
Description	good	good
Solubility	good	good
m.p. (°C)	about 280	about 285
Specific rotation	−120°	−116°
Loss on drying (%)	0.1	0.18
Residue on ignition (%)	negligible	negligible
Lumiflavin test	good	good
Nitrogen (%) (theory : 14.89)	14.95	14.68
Assay (%) : Colorimetry	100.2	100.0
: Fluorometry	100.1	100.0
: Azotometry	99.6	99.5

4.　ビタミンB_6（塩酸ピリドキシン）

CH_2OH
HOH_2C　$-OH$
$-CH_3$　Cl^-
$\overset{+}{N}$
H

$C_8H_{11}O_3N \cdot HCl = 205.64$

注射用B_6 結晶を更に精製して純品とした.

現行標準品（国産）及び旧標準品（輸入品）の試験成績を米国薬局方標準品の分析成績と比較すれば次の如くである.（Table 5）

Table 5.　Critical Analytical Data on Present Vitamin B_6 Preparations.

Specifications \ Samples	A	B	C
Description	good	good	good
pH of 5% solution	2.85	2.75	2.83
M. P. (°C)	206.0～206.5	204.6～205.0	205.0～205.8
Loss on drying (%)	negligible	negligible	negligible
Residue on ignition	negligible	negligible	negligible
Heavy metals (p. p. m.)	20	20	20
Nitrogen (%) (theory : 6.81)	7.11	6.74	6.96
Assay (%)	99.7①	99.7①	99.5①
	100.0②	100.0	100.0②
	100.5③	100.0③	—

① From Hydrogen Chloride.
② Colorimetry (Sample B = 100.0%)
③ Azotometry
A : Standard Preparation under test
B : U. S. P. Reference Standard
C : J. P. Standard (old)

なおN/50酢酸ナトリウム液に溶かした溶液の紫外部吸収は Fig. 1に示す. 極大吸収 325mμ において, 20γ/cc の濃度では吸光度はいずれも0.710を示した.

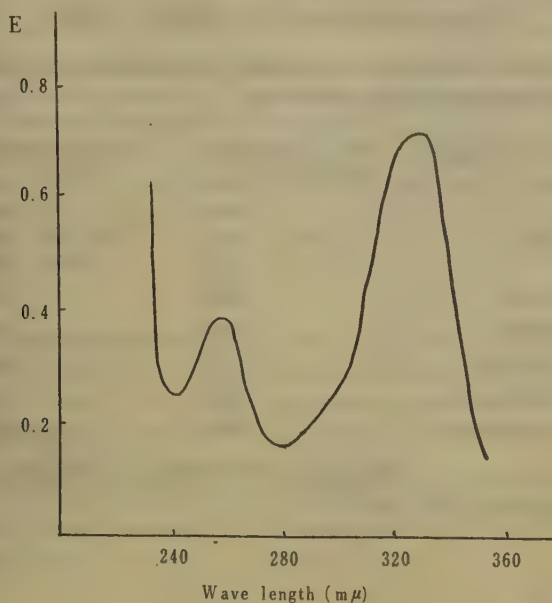



Fig. 1. Absorption Spectrum of Vitamin B_6 20γ/cc in N/50 CH_3COONa

5. ビタミンC

(構造式: C(=O)—C(OH)=C(OH)—C(H)—C(H)(OH)—CH$_2$OH, 環内O)

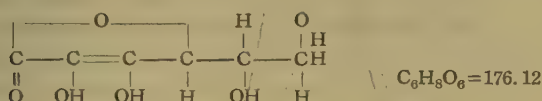
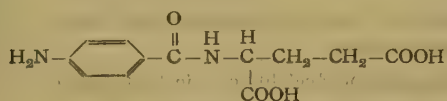
$C_6H_8O_6$=176.12

注射用の特によい結晶を精製して純品とした．保存は不活性ガス充塡が望ましい．米薬局標準品の分析成績と比較すれば次の如くである．（Table 6）

Table 6. Critical Analytical Data on Present Vitamin C Standards.

Specifications \ Standards	J. P.	U. S. P.
Description	good	good
Specific rotation	+20.75°	+20.75°
Residue on ignition	negligible	negligible
Heavy metals	about 5 p.p.m.	about 5 p.p.m.
Assay (%)	99.8	99.8

6. パラアミノベンゾイルグルタミン酸

$$H_2N-C_6H_4-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-\overset{H}{N}-\underset{COOH}{\overset{H}{C}}-CH_2-CH_2-COOH$$

$C_{12}H_{14}N_2O_5$=266.25

葉酸合成の際に得られるパラアミノベンゾイルグルタミン酸の結晶を水から数回再結晶し，50°C 以下で4時間乾燥して純品とした．

少量の時は塩化カルシウム入りデシケータで減圧乾燥する．
米国薬局方標準品のパラアミノ安息香酸の分析成績を参考のため併記する．（Table 7）

Table 7. Critical Analytical Data on Present Para-aminobenzoylglutamic Acid and Para-aminobenzoic Acid.

Specifications \ Samples	Para-aminobenzoyl-glutamic Acid		Para-aminobenzoic Acid	
Description		good		good
Solution in alcohol	1 in 200	: clear	1 in 100	: clear
m.p. (°C)		172		186.5～187.5
Loss on drying (%)		0.03		0.05
Residue on ignition (%)		0.01		0.02
Assay (%) : acidometry		—		99.9
diazometry		99.2		99.2
azotometry		100.3		100.0

なおN/10水酸化ナトリウム液に溶かしたものの紫外部吸収は 272～275mμ において極大値を示した．パラアミノ安息香酸は265mμに吸収極大値があつた．（Fig. 2）

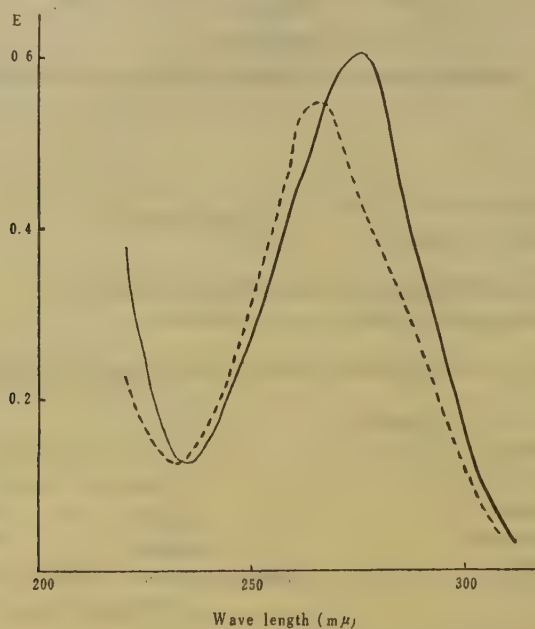



Fig. 2. Absorption Spectrum of Para-aminobenzoyilglutamic Acid and Para-aminobenzoic Acid.

——— Para-aminobenzoylglutamic Acid 10γ/cc (in N/10 NaOH)

- - - - Para-aminobenzoic Acid 5γ/cc (in N/10 NaOH)

なお結晶標準品ビタミンB_1,B_2,B_6,C及びパラアミノベンゾイルグルタミン酸は有効期間はないが，一度開封したものはなるべく早く使用することが望ましい．特にビタミンCは不活性ガス充塡で保存すること．保存がよければ目下の所3年間は室温で不変である．B_1液は前述の通り有効期間は1年間で，それ以後は用いない．

終りに，御指導を賜つた長沢佳熊部長，小川太郎前部長，原稿を校閲された野崎泰彦部長，アゾトメトリー及び元素分析について御協力を得た細貝技官及び石垣氏に感謝する．

なおビタミンB_1, B_1液,C及びパラアミノベンゾイルグルタミン酸の製造には「武田薬品工業株式会社研究所」の協力を得た．ビタミンB_6については「第一製薬株式会社高槻工場」の協力を得，B_2製造については「わかもと製薬株式会社」及び「東京田辺製薬株式会社」の協力を得た．以上各製造における協力各社に感謝の意を表する．

総括並びに結論

従来用いられていた国立衛生試験所標準品ビタミンB_1，B_2，C及びB_1液の製造並びに品質について，いずれも極く最近の標準品の分析成績を主とし，米国薬局方標準品の分析成績等と比較した．又ビタミンB_6については国産標準品の採用，パラアミノベンゾイルグルタミン酸の結晶標準品の販布に際し，上記B_1，B_2等と同じく合成，試験項目及び試験法の調査並びに設定を行い，これらより得られた試験成績をB_6は米国薬局方標準品の分析成績等と比較し，他者は対応するパラアミノ安息香酸の分析成績を参照した．

上掲の試験成績の示す通り，今回の六種の標準品は米国薬局方標準品同様に使用できると考えられる．

なおこの試験項目，試験法及び試験成績等は今時新に製造する際の参考ともなり，又必要があれば同等或いはそれ以上の製品を製造し得る．

文　献

1) 広瀬：衛生試験所報告 74，431 (1956).
2) Pharmacopoeia Japonica (J. P.)：(第6改正) 日本薬局方.
3) Pharmacopoea Internationlis (I. P.)：国際薬局方 (1951).
4) Pharmacopoeia of The United States (U. S. P.)：(第15改正) 米国薬局方.
5) British Pharmacopoeia (B. P.)：英国薬局方 (1953).
6) Formulae Nationales Japonicae：(第二改正) 国民医薬品集.
7) Deutsches Arzneibuch (D. A. B.)：独国薬局方.
8) The National Formulary X (N. F.)：米国国民医薬品集.

Summary

The preparation and the analyses of six Vitamin reference standards, Vitamins B_1, B_2, B_6, C and Para-aminobenzoylglutamic Acid and Vitamin B_1 Solution (1 mg/2 cc) are described.

Para-aminobenzoylglutamic Acid is new standard for colorimetric assay of folic acid.

The results of analyses are tabulated in Table 3, 4, 5, 6 and 7 together with those of the U. S. P. Reference Standards.

Received June 18, 1957

米粒寄生糸状菌の分離培養方法に関する研究 I.

田 中　穣，平 山 重 勝，* 倉 田　浩，坂 部 フ ミ，
稲 垣 尚 起，松 島　崇，宇田川俊一，

Studies on the Technique for the Isolation for the Presence of Rice Grain Fungi. I.

Yutaka TANAKA, Shigekatsu HIRAYAMA, Hiroshi KURATA, Fumi SAKABE,
Naoki INAGAKI, Takashi MATSUSHIMA and Shunichi UDAGAWA,

はじめに　病変米菌の分離培養方法に関する基礎的試験を実施したので，その結果を報告する．本試験は次の4部から成つている．すなわち．

実　験　I　分離手技に伴う誤差の検定
実　験　II　新分離用洗滌器の考案
実　験　III　洗滌処理方法の検討**
実　験　IV　試験用培地の選択

病変米の検出方法には菌類の分離培養に用いられる一般方法が採用されている．この方法は米粒内部に浸入する菌を検出するのを主目的とするのであるから，あらかじめ試料を滅菌水で数回十分に洗滌し，外部に附着する雑菌を除去した後，これを寒天培地上に培養するのである．この方法で懸念されることは個人の手技によつて行われる洗滌操作が，たとえ規定通り実施されたとしても，培養結果出現する微生物の数量が個人間にかなりの相異がでてくるのではなかろうかと云うことである．このような手技の優劣が検出結果にあらわれてくる影響の程度を知つておくことは検定法の確実性を実証する意味からも極めて重要な事柄と考えたので，実験 I：同一試料を同時に数名の異る技術者が分離した場合の誤差の検定を行なつてみた．

次にこの洗滌法は実際上かなりの手数を必要とするので，なるべく器具によつて自動的に行い得れば，能率が上るばかりでなく，個人誤差がなくなるという利点があるものと考えたので，実験 II：新簡易洗滌器を考案してその効果を比較検討した．

更にこれらの洗滌に用いる滅菌水に物理性または，殺菌性を附与すれば，洗滌回数を極力少なくすることができるであろうと考え，実験 III：培養検査時における米粒の洗滌処理の検討を行つた．

かくして洗滌処理された米粒の培養に用いる培地は対照病変米菌は勿論のこと，多くの糸状菌が得られる適切な培地であることが望ましいので，実験 IV：試験用培地の選択とその培養の条件についての検討を併せて試験した．

試 験 方 法

実験 I の試験方法

i　試料のサンプリング

1袋総数量 2.28kg の輸入米の全量を清潔な紙上に取り出し，試料が均一になるように十分混和しながら薄くひろげ任意にスプーンで 25～30 カ所より少量ずつの米を取り集めて全量を 10g としたものを1試料とした．

ii　植付順位並びに期日

3名の植付担当者甲，乙，丙が個別に順序をかえて3日間，無菌室内で植付を行つた．習熟度は甲が最も熟練し，丙，乙の順序に低くなる．1回に2試料を，1試料 100 粒培養とした．この組合せは，第1回（11月22日）

*　三重大学農学部教授

**　本項の一部は KURATA, H., OGASAWARA, K. & FRAMPTON, V. L.: Microflora of milled rice. Cereal chemistry 34: (1), 47—55. 1956 に報告した．

甲，乙，丙，第2回（11月24日）丙，甲，乙，第3回（11月26日）乙，丙，甲の順位とした．

iii　分離培養方法（常法）試料10gをあらかじめ滅菌した三角フラスコ（200cc容）に入れ，これに1回約75ccの滅菌水を注いで，20回繰返し洗滌した．この場合1回の振盪は徒手で丁寧に50回，その所要時間は約10分とした．洗滌後，水を十分切つてから滅菌ペトリ皿にあけ，ここから1粒宛ピンセットで武藤式培養試験管* に投入した．ピンセットは1粒毎に火焔消毒をなし，ピンセットによる菌の伝播を防止した．培地はCzapek氏寒天培地に，25°C，7日間培養後，1粒毎の微生物発生数を調査した．

実験IIの試験方法

試料を Fig. 1に示すような簡易洗滌器を用いて洗滌した後，実験Iと同様な常法によつて培養し，徒手洗滌法と比較した．

i　簡易洗滌器の装置並びに操作

洗滌器は洗滌ビン（a）と滅菌水タンク(b)とに分かれるが，両者をゴム管で連絡する．各口に綿栓をしてオートクレーブで，1気圧，15分滅菌する．滅菌水タンクは約800cc容量で，60cc宛10等分の目盛が付けてある．

洗滌ビンは上部の広口より試料を入れ，ピンチコック（c）を開けてビン内に60ccの滅菌水を導く．次に二連球にて空気沪過管（d）を通してビン内に送風するとビン内の供試米は空気の圧力と気泡によつて撹拌される．一定時間送風したら，ピンチコック（e）を開けると廃液は篩板を通つて排出される，送風は二連球を50回手早く押すことによつた．

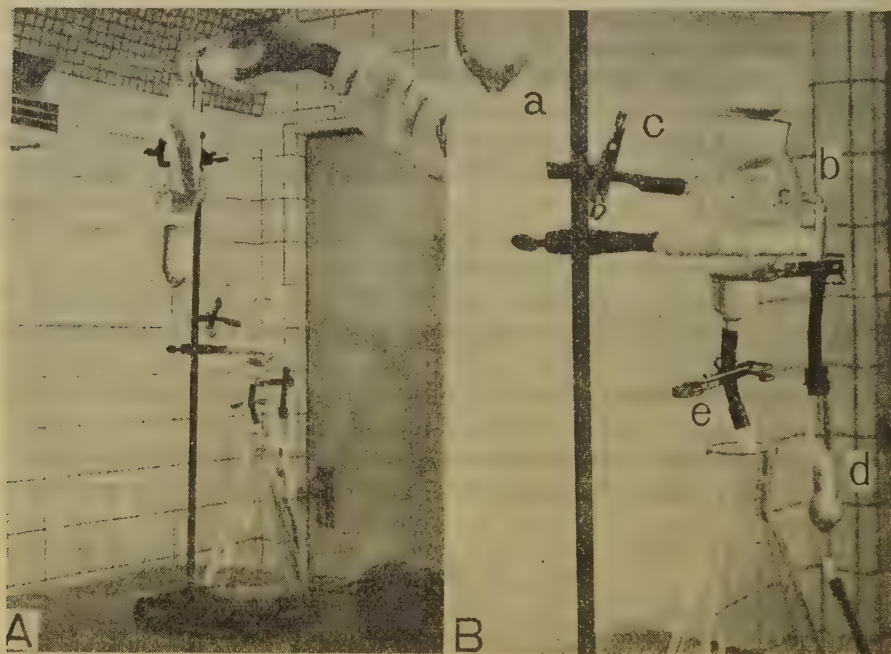



Fig. 1　菌類分離用簡易洗滌装置（A），同洗滌器部劃大（B），

ii　比較試験の組合せ

本試験は異る試料で5回実施した．すなわちＳI（南部印度米），ＳII（ビルマ米），ＳIII（ビルマ米），ＳIV（ビルマ米），ＳV（ビルマ米）とし，試料は十分に混和したものを2分し，その各々より実験Iと同様にサンプリングしたものを用いた．2名の技術者（甲，乙）が午前と午後に分れて，それぞれ簡易法（洗滌器使用）と常法（徒手洗滌）とを交互に行い対比培養した．その組合せは第1表の通りとなる．

*　武藤式培養缶は50本の小試験管を保持するようになつている．すなわち1缶で50粒が培養できる．

第1表　常法と簡易法の試験組合せ

試料 ＼ 洗滌法	S Ⅰ a.m	S Ⅰ p.m.	S Ⅱ a.m.	S Ⅱ p.m.	S Ⅲ a.m.	S Ⅲ p.m.	S Ⅳ a.m.	S Ⅳ p.m.	S Ⅴ a.m	S Ⅴ p.m.
常法	甲 (20)	乙 (18)	甲 (20)	乙 (19)	乙 (19)	甲 (19)	乙 (17)	甲 (18)	乙 (17)	甲 (20)
簡易法	乙 (16)	甲 (16)	乙 (17)	甲 (17)	甲 (17)	乙 (15)	甲 (16)	乙 (16)	甲 (16)	乙 (16)

註　(　) 内数字は洗滌所要時間，平均所要時間は常法18分簡易法16分である．洗滌回数は共に20回である．

実験Ⅲの試験方法

試料の洗滌に表面殺菌剤として昇汞 (0.1%)，硝酸銀 (0.1～0.01%)，グアノフラシン 5-Nitro-2-furfurylidene-amino-guanidine 乳酸塩及び塩酸塩 (0.1, 0.05, 0.01%) 溶液を，また表面活性剤の Tween 80* (0.1, 0.05, 0.01%) 溶液を用い，常法と比較した．

この場合，各回の洗滌廃液を平面培地 (Czapek培地) に流し込んで微生物の発生を検した．

実験Ⅳの試験方法

常法によつて処理した試料を次の9種類の培地に培養し，細菌，酵母，糸状菌の発生程度を調査した．

1. Czapek-Dox 寒天培地　pH 5.3
2. Acidified Czapek-Dox 寒天培地　pH 4.0
3. NaCl 添加 Czapek-Dox 寒天培地　pH 5.3
4. Potato-Dextrose 寒天培地　pH 5.4
5. Acidified Potato-Dextrose 寒天培地　pH 4.0
6. NaCl 添加 Potato-Dextrose 寒天培地　pH 5.4
7. Waksman 寒天培地 pH 5.2
8. Acidified Waksman 寒天培地　pH 4.0
9. NaCl 添加 Waksman 寒天培地　pH 5.2

酸性培地は使用直前に，10%酒石酸を培地 100 cc当り 1.5 cc 添加することによつて pH 4 に調整した．NaCl は同様に使用直前に，培地 100 cc 当り 7.5 g を無菌的に添加した．

試料は常法で培養成績の分つたものの中から，汚染程度の異なるもの4点を選出して供試した．

試験結果並びに考察

実験Ⅰ　分離手技に伴う誤差の検定の結果並びに考察

甲，乙，丙の3者が培養した結果を総括して第2表に示す．

第2表　同一試料を異なる植付担当者が常法に従つて洗滌した場合の微生物数

植付担当者別検体記号			無菌粒	細菌 酵母	放線菌	*Penicillium* 属菌 *P. isl*	*P. cit*	その他	計	*Aspergillus* 属菌	*Mucorales*	不全菌	糸状菌総数
甲	A_1	イ	10	16	1	1	0	4	5	24	0	0	29
		ロ	4	24	1	1	0	2	3	25	0	1	29
	A_2	イ	5	14	1	2	1	3	6	33	0	2	41
		ロ	11	21	0	0	0	1	1	21	0	2	24
乙	A_3	イ	2	22	3	1	1	4	6	33	0	1	40
		ロ	3	21	1	3	0	1	4	25	2	1	32
	A_4	イ	6	23	1	2	0	1	3	21	0	2	26
		ロ	6	25	1	0	0	2	2	20	0	1	23
丙	A_5	イ	9	13	1	1	1	3	5	29	0	1	35
		ロ	10	19	1	2	1	2	5	30	1	0	36
	A_6	イ	9	22	1	0	0	4	4	21	0	0	25
		ロ	14	17	1	1	0	2	3	25	0	3	31

* Polyoxyethylene sorbitan monooleate

植付担当者別 検体記号			無菌粒	細菌・酵母	放線菌	*Penicillium* 属菌				*Aspergillus*属菌	*Mucorales*	不完全菌	糸状菌総数
						P. isl.	*P. cti.*	その他	計				
丙	B_1	イ	13	17	0	0	0	3	3	20	0	5	28
		ロ	8	21	1	0	1	3	4	24	0	1	29
	B_2	イ	10	10	3	1	1	3	5	30	0	1	36
		ロ	15	20	1	0	0	1	1	17	0	3	21
甲	B_3	イ	7	24	0	1	0	1	2	23	0	1	26
		ロ	8	23	0	1	0	0	1	21	0	0	22
	B_4	イ	12	18	2	2	0	2	4	15	1	1	21
		ロ	7	17	2	1	0	0	1	27	2	0	30
乙	B_5	イ	5	21	0	1	0	2	3	30	0	1	34
		ロ	6	16	1	3	0	4	7	24	1	3	35
	B_6	イ	7	20	2	0	0	6	6	20	3	0	29
		ロ	4	26	2	3	0	3	6	19	1	1	27
乙	C_1	イ	6	25	1	1	0	3	4	22	1	0	27
		ロ	6	25	1	2	0	1	3	23	0	0	26
	C_2	イ	3	17	0	3	0	3	6	31	0	2	39
		ロ	2	17	0	4	1	2	7	27	0	2	36
丙	C_3	イ	10	17	0	3	0	1	4	22	1	1	28
		ロ	6	22	5	0	0	1	1	19	1	1	22
	C_4	イ	4	20	2	1	0	7	8	25	1	2	36
		ロ	18	19	1	0	0	4	4	18	0	0	22
甲	C_5	イ	16	18	0	1	0	3	4	16	1	2	23
		ロ	12	19	0	1	0	1	2	22	0	1	25
	C_6	イ	12	11	1	0	1	4	5	25	1	1	32
		ロ	16	20	1	1	0	3	4	15	0	2	21

註　A_1 は1試料よりの100粒培養を示す．
　(イ)，(ロ)はその時の武藤式培養缶番号（50粒培養）
　P. isl. = *Penicillium islandicum* ; *P. cit.* = *Penicillium citrinum*

1. *P. islandicum*, *P. citrinum*の分離粒数の誤差検定

i. 植付期日，植付順位の間に認められる差異．

第2表に基いて *Penicillium islandicum* (P. i. 略)，及び *Penicillium citrinum* (P. c. 略) の出現数を集計して2日おきの植付期日，又は植付順位の間における変動を考察してみた．

第3表　*P. ilsandicum* 及び *P. citrinum* の検出粒数の集計

試験期日＼植付順位	1			2			3			計
第1回（11月22日）	甲	2 3	5	乙	5 2	7	丙	5 1	6	18
第2回（11月24日）	丙	1 2	3	甲	2 3	5	乙	4 3	7	15
第3回（11月26日）	乙	3 8	11	丙	3 1	4	甲	2 2	4	19
計			19			16			17	52

註　数字はP. i.，P. c. 発生数の合計で，100粒当りの検出粒数

第3表によつて，同一時期に同じ技術者が2試料から別々に検出するP. i.，P. c. 数のばらつきを見ると，このような 100 粒を抽出しておこなう検査方法では当然予想される程度のもので 有意差は認められない．同様に植付

期日，植付順位によつて検出される数の間にも有意差は認められなかつた.

ii. 植付担当者間に認められる差異

個人別の検定を行うために個人別検出粒数を第4表にとりまとめた.

第4表 個人別 P.i., P.c. 分離粒数集計

植付担当者	甲	乙	丙	計
分離粒数	14	25	13	52
%	2.3	4.2	2.2	2.9

個人別の検出粒数についてχ^2 検定をすると.

$\chi^2 = 5.27$ D. f. = 2 P = 0.05～0.10

このように確率値がかなり低く有意差ありと認められそうであるので，無菌粒の集計について同様の検定を次に行なつてみた.

2. 植付担当者間に認められる無菌粒数の誤差検定

無菌粒数について同様な集計をしてみると第5表，第6表の通りである.

i. 植付期日，植付順位の間に認められる差異

第5表 無菌粒の検出粒数の集計

植付順位 / 植付期日	1	2	3	計
第1回 (11月22日)	甲 14, 16 } 30	乙 5, 12 } 17	丙 19, 23 } 42	89
第2回 (11月24日)	丙 21, 25 } 46	甲 15, 19 } 34	乙 11, 11 } 22	102
第3回 (11月26日)	乙 12, 5 } 17	丙 16, 22 } 38	甲 28, 28 } 56	111
計	93	89	120	302

P.i., P.c. の分離粒数を検定した結果と同様に無菌粒数についても植付期日，植付順位の間に有意差が認められない.

ii. 植付担当者間に認められる差異

個人差の検定を無菌粒数について行つてみると.

第6表 個人別無菌粒数集計

植付担当者	甲	乙	丙	計
無菌粒数	120	56	126	302
%	20.0	9.3	21.0	16.8

個人別に出現した無菌粒数の間の有意差について χ^2 検定を行つたところ.

$\chi^2 = 3.59$ d. f. = 2 P = 0.10～0.25

結果に示す通り，余り顕著でないが有意差が認められそうである.

小 結

植付期日の間に誤差がないということは，試料を4日間実験室内で保存する間に微生物による汚染が進行しなかつたということで，これは当然であろう. 植付順位の間の誤差も認められていない. この事実はいつも洗滌操

作が同一の無菌条件下の室内において実施されたと考えてよい．

個人差については甲，乙，丙の3者のうち乙が他の2者に較べて，P. i.，P. c. をより多く分離し，かつ無菌粒数が少い傾向がみられたので以上の統計的な検定を行つたところ，やや有意性が認められそうであつた．

然しながらこの結果からでは直ちに本法を不適とするほどの誤差とも考えられない．より熟練すれば個人差がこれ以上少なくなり十分検定に使用できるものと思われる．

実験Ⅱ新分離用洗滌器の考案結果並びに考察

1. 個人差並びに試験時期別（午前・午後）間の相異

実験Ⅱの結果を総括して第7表に示す．

第7表　簡易洗滌器の性能比較試験結果（その1）

試料並びに試験別			無菌粒	細菌・酵母	放線菌	*Penicillium* 属菌	*Aspergillus* 属菌	*Mucorales*	不完全菌	糸状菌総数	微生物総数
S Ⅰ	am	常（甲）	0	12	0	8	79	46	1	134	146
		簡（乙）	0	83	0	4	102	18	3	127	210
	pm	常（乙）	0	63	0	19	77	14	1	111	174
		簡（甲）	0	9	0	1	107	33	1	142	151
S Ⅱ	am	常（甲）	49	29	12	1	1	0	8	10	51
		簡（乙）	43	28	18	1	3	0	18	22	68
	pm	常（乙）	50	25	16	0	1	0	10	11	52
		簡（甲）	56	24	21	0	0	0	3	3	48
S Ⅲ	am	常（乙）	57	11	4	3	7	0	19	29	44
		簡（甲）	20	62	11	6	7	3	2	18	91
	pm	常（甲）	0	93	0	6	9	2	2	19	112
		簡（乙）	39	30	12	4	12	1	11	28	70
S Ⅳ	am	常（乙）	69	17	3	0	3	0	8	11	31
		簡（甲）	30	48	9	1	7	0	10	18	75
	pm	常（甲）	69	12	7	0	5	0	8	13	32
		簡（乙）	54	21	10	0	3	0	15	18	49
S Ⅴ	am	常（乙）	75	16	2	0	0	0	7	7	25
		簡（甲）	63	27	4	0	1	0	10	11	42
	pm	常（甲）	57	25	5	0	1	0	15	16	46
		簡（乙）	75	11	7	0	1	0	7	8	26
合計		常法	426	303	49	37	183	62	79	361	713
		簡易法	380	343	92	17	243	55	80	395	830

第7表にもとづいて個人差及び午前と午後との微生物の検出率を比較してみた処，全体として差異はないもののようにみうけられた．従つてこの二つの要因については考慮に入れる必要なしと考え，次に常法と簡易法との間の差異を検定することにした．

第8表に従つて常法と簡易法との間の微生物検出率を統計的に比較した．

第8表　簡易洗滌器の性能比較試験結果（その2）

試料並びに試験別		無菌粒	細菌・酵母	放線菌	*Penicillium* 属菌	*Aspergillus* 属菌	*Mucorales*	不完全菌	糸状菌総数
S I	常	0	75	0	28	156	60	2	245
	簡	0	92	0	5	209	51	4	269
S II	常	99	54	28	1	2	0	18	21
	簡	99	52	39	1	3	0	21	25
S III	簡	57	104	4	9	16	2	21	48
	常	59	92	23	10	19	4	13	46
S IV	常	138	29	10	0	8	0	16	24
	簡	84	69	19	1	10	0	25	36
S V	常	132	41	7	0	1	0	22	23
	簡	138	38	11	0	2	0	17	19
計	常	426	303	49	37	183	62	79	361
	簡	380	343	92	17	243	55	80	395

2. 放線菌の検出率についての常法と簡易法の比較

先ず放線菌の検出率について検定を行つたが，試料S Iは1粒から2種以上の別属菌が出現するものが多いので検定の対象より除外し，S IIよりS Vまでの4試料について x^2 検定をなした．

第9表　放線菌の出現率集計（その1）

洗滌別＼試料	S I	S II	S III	S IV	S V	計
常法	0	28	4	10	7	49
簡易法	0	39	23	19	11	92
計	0	67	27	29	18	141

x^2 検定結果：

S II……x^2 = 2.169　d.f. = 1　P : 0.1～0.05　有意差なし

S III……x^2 = 28.796　〃　P < 0.01

S IV……x^2 = 3.011　〃　P : 0.1～0.05　有意差なし

S V……x^2 = 0.931　〃　P : 0.5～0.3　〃

簡易法が常法より特に多くの放線菌が検出されている場合は試料S IIIについてだけであり，これは明らかに有意差が認められた．更に全体としてこれをみると，

第10表　放線菌の出現率集計（その2）

洗滌別＼放線菌	検出数	非検出数	計
常法	49	951	1000
簡易法	92	908	1000
計	141	1859	2000

x^2 = 14.11　d. f. = 1　P < 0.001

すなわち確率の値が小さく有意差が認められる．全体としても常法と簡易法との間の放線菌の出現数には差異があるものと断定された．

3. 無菌粒数についての常法と簡易法間の比較

次に無菌粒数について同様に検定を行つてみると次の通りである．

第11表　無菌粒数の出現率集計

洗滌別	無菌粒	微生物粒数	計
常法	426	574	1000
簡易法	380	620	1000
計	806	1194	2000

$\chi^2 \fallingdotseq 4.398$　d. f. = 1　$0.05 > P > 0.02$

このように無菌粒について検定した結果では両者の間にやや有意差ありと判定された．

4. 細菌酵母粒数の検定

SⅠ，SⅡ，SⅤについては明らかに有意差がないと考えられるので，SⅢ，SⅣについて検定したところ，SⅣを用いた場合のみ差異が認められた．次に全体として χ^2 検定を行つた結果からは結局有意差なしと判定された．

5. 糸状菌粒数の検定

最後に糸状菌粒数について分散分析を行つてみた結果では，

第12表　糸状菌粒数の出現率集計

洗滌別＼試料別	SⅠ	SⅡ	SⅢ	SⅣ	SⅣ	計
常法	245	21	48	24	23	361
簡易法	269	25	46	36	19	395
計	514	46	94	60	42	756

糸状菌粒数の出現率の分散分析表

	d. f.	S. S.	M. S.	F.
全体	15	791.75		
Sample	3	419.25	139.75	3.96*
常法：簡易	1	6.25	6.25	—
甲：乙	1	42.25	42.25	—
am.：pm.	1	6.25	6.25	—
誤差	9	317.75	35.31	

分散分析の結果が示すように糸状菌の分離数に関して常法と簡易法とを比較した結果では両者の間に有意差なしという結論を得た．

小結

以上同一試料を用いて常法と簡易法間に検出した微生物粒数間にどの程度差異があるかを検定した結果では，

i. 細菌及び酵母数では全体として有意差がない．

ii. 糸状菌数では全体として有意差がない．

iii. 放線菌数では全体として有意差あり．

iv. 無菌粒数では全体としてやや有意差が認められる.

これらの結果から綜合考察を試みると，簡易法でも常法とほぼ同様の結果が得られることから両者間の洗滌効果に差異あるものとは考えられない.

この程度の誤差ならば実際検定に支障がないようである．従つてこの簡易法を実際に利用しても差支えないと結論してよいであろう．所要時間の短縮には余り期待がもたれなかつたが，洗滌時の水の交換と器具の火焔消毒操作などの一連の手間がはぶけること，また殺菌水の準備作業なども簡易化されるので，全体として常法より能率的と考えられる.

実験III　洗滌処理方法に関する実験の結果並びに考察

糸状菌検出の目的では，米粒表面に附着する雑菌を除去し，内部に潜在する糸状菌をさまたげなく分離するのが望ましい．従つてこの条件に合う洗滌法を知るために，種々の洗滌剤を組合せた実験を行つたが，先ず最初に 0.1% $AgNO_3$ 溶液による洗滌を実験した．（第13表）

1.　0.1% $AgNO_3$ を洗滌液とした場合

第13表　硝酸銀洗滌法と常法との比較

試料 / 処理 / %	I		II		III	
	常法	0.1% $AgNO_3$	常法	0.1% $AgNO_3$	常法	0.1% $AgNO_3$
無菌粒	93.3	99.7	71.0	99.3	6.3	95.0
糸状菌粒	2.7	0.3	4.7	0.7	9.0	5.0
放線菌粒	0	0	0	0	0	0
細菌及酵母粒	4.0	0	24.3	0	84.7	0

註）試料は米国南部米

常法とは滅菌水で 20 回洗滌

$AgNO_3$ 処理は，最初，0.1% $AgNO_3$に 3 分間浸漬，後直ちに 0.1%NaCl で 3 分間洗滌した後，100cc の滅菌水で 5 回水洗した.

本処理では明らかに細菌・酵母の発生が抑制されている．すなわち表面殺菌がかなり完全に近く行われているもののようである．これに対して糸状菌では，細菌酵母ほどに影響をうけていないが，やや抑えられている傾向がうかがえる．そこで処理時間を更に短縮すれば，今まで通りに細菌，酵母を抑え，かつ糸状菌には影響のより少ない結果が得られるのではないかと考え硝酸銀溶液の処理時間について検討した.

2.　硝酸銀処理と時間との関係

第14表　硝酸銀処理時間の影響

処理方法 / %	0.1% $AgNO_3$ の処理時間（分）			
	0（対照）	1	2	3
無菌粒	2.0	62.6	96.6	97.0
糸状菌粒	54.3	37.0	3.0	2.3
放線菌粒	0	0	0	0
細菌及酵母粒	18.0	0.3	0.3	0.3

註 1）試料は米国南部米

細菌・酵母に及ぼす影響は既に 1 分処理で顕著で，その後，2, 3 分と時間を増してもさして変化がない．糸状

菌では1分でかなり減少し，2，3 分では急激に少なくなる．このことは1分処理ではたいした殺菌作用をうけないが，2，3 分では既に内部に潜入する菌糸にまで，殺菌作用が及んだものと判断される．従つてこの結果から硝酸銀処理を実際に使用しうる限界は1分までとみなされる．然し1分処理でも糸状菌に対して安全とはいい難いので，更にNaClによる脱銀の効果を検討するために次の実験を行つた．（第15表）

3. $AgNO_3$ 処理時の脱銀の検討

第15表 $AgNO_3$ 処理時の脱銀効果

試料 / 処理別 / %	Ⅰ			Ⅱ			Ⅲ	
	$AgNO_3$（0.1%）滅菌水(1) 滅菌水(2)	$AgNO_3$（0.1%）NaCl 0.1%	$AgNO_3$（0.1%）NaCl（0.1%）滅菌水	$AgNO_3$（0.1%）滅菌水(1) 滅菌水(2)	$AgNO_3$（0.1%）NaCl（0.1%）—	$AgNO_3$（0.1%）NaCl（0.1%）滅菌水	常法	$AgNO_3$（0.1%）NaCl（0.1%）滅菌水
無菌粒	99.0	98.6	98.0	98.0	96.6	98.3	54.3	97.7
糸状菌粒	1.0	1.0	2.0	1.3	3.0	1.6	12.0	6.0
放線菌粒	0	0	0	0.3	0.3	0	8.7	0.3
細菌及酵母粒	0	1.0	0	0.3	0	0	22.0	0

各処理間に差異が認められない．すなわち $AgNO_3$ 浸漬後の NaCl での脱銀法は効果があるとはみうけられない．更に滅菌水による洗滌を加えた場合でも同様に効果がないようである．試料Ⅲでは常法と比較してみたところ，やはり表面の細菌酵母だけを殺菌除去するというだけでなく糸状菌に対してもかなり殺菌作用が及んでいるものと判断された．

4. Tween 80 を洗滌剤として用いた場合

硝酸銀処理はたとえ NaCl による脱銀手段を併用しても，まだ米粒表面に銀イオンが残り内部より発生する糸状菌に対して殺菌作用を及ぼすものと考えられるので，糸状菌検出の目的を満足させ得ない．よつて次に表面活性剤の Tween 80 を用いて次の実験を行つた．その結果を第16表に示す．

第16表 Tween 80 を洗滌剤として用いた場合の効果

処理別 / %	常法	Tween 80*		$AgNO_3$
		0.1%	0.5%	0.1%
無菌粒	6.3	77.7	67.1	95.0
糸状菌粒	9.0	9.3	10.9	5.0
放線菌粒	0	0	0	0
細菌及酵母粒	84.7	12.9	21.9	0

註 * Tween 80 添加の滅菌水で20回，常法通り洗滌した．

Tween 処理では著しく細菌酵母粒数が少なくなつているが糸状菌数は常法とほぼ同様である．確かに米粒表面の細菌・酵母をよく洗除し，然も内部に存在する糸状菌を抑制することもないので本検定の目的に合致する方法と考えられる．

本実験でも硝酸銀処理は明らかに殺菌力が強すぎて実際に用いられぬ結果となつた．

5. Tween 80 処理とグアノフラシン -HCl 塩を洗滌剤に用いた場合の比較

Tween 80 及びグアノフラシン-HCl塩の0.01又は0.05%溶液 300cc を用いて5回に分けて洗滌し（1回約 60cc）後滅菌水で5回洗滌した．$AgNO_3$ 処理の方法は前述の通りである．液温は約 8° であつた．

Ⅰ～Ⅳまでの試料を用いた実験成績を第17表に更に，これをFig. 2 に図示する．

第17表　Tween 80，グアノフラシン，硝酸銀を洗滌剤として用いた場合の効果比較

試料	処理別		糸状菌数					*Actinomycetes*	細菌・酵母	無菌粒数	備考
			Penicillium 属菌	*Aspergillus* 属菌	*Mucorales*	不完全菌	計				
I イタリヤ米	グアノフラシン	0.01%	1	2	4	4	11	0	99	1	洗滌直後米粒黄色に着色する．
		0.05%	0	1	0	0	1	0	70	29	
	Tween80	0.01%	2	1	0	0	3	0	86	12	
		0.05%	2	3	0	0	5	0	91	4	
	$AgNO_3$ 0.01%にて表面殺菌		2	7	0	4	13	0	56	32	
	滅菌水	10回	8	5	2	2	17	0	55	35	
		20回	3	5	0	0	8	0	59	36	
II イタリヤ米	グアノフラシン	0.01%	1	0	0	0	1	0	92	8	洗滌直後米粒黄色に着色する
		0.05%	1	0	0	0	1	0	92	8	
	Tween80	0.01%	0	0	0	0	0	0	94	6	
		0.05%	0	1	0	0	1	0	85	14	
	$AgNO_3$ 0.01%にて表面殺菌		0	1	0	0	1	0	78	21	
	滅菌水	10回	0	0	0	0	0	0	82	18	
		20回	0	0	0	1	1	0	51	48	
III ビルマ米	グアノフラシン	0.01%	0	0	0	0	0	0	4	96	洗滌直後米粒黄色に着色する．
		0.05%	1	1	0	0	2	0	3	95	
	Tween80	0.01%	0	0	0	0	0	0	3	97	
		0.05%	0	0	0	0	0	0	1	99	
	$AgNO_3$ 0.01%にて表面殺菌		1	0	0	1	2	0	2	96	
	滅菌水*	10回	0	0	0	0	0	1	3	96	
		20回	0	0	0	2	2	0	6	93	
IV 加州米	グアノフラシン	0.01%	18	12	4	2	36	4	43	30	洗滌直後米粒黄色に着色する．
		0.05%	18	8	2	3	31	2	30	33	
	Tween80	0.01%	17	9	1	1	28	0	40	37	
		0.05%	25	20	5	2	52	3	73	2	
	$AgNO_3$ 0.01%にて表面殺菌		12	12	1	1	26	1	26	50	
	滅菌水*	10回	40	19	2	6	67	3	31	15	
		20回	28	12	1	1	42	1	38	29	

註　* 試料 III，IV について滅菌水洗滌（常法）の廃液の第1回，第10回，第20回目をとつて Czapek 培地に流し込み平面培養し微生物の発生の有無を調査した．稀釈は原液 1cc を 15cc の培地に流し込んだ．Fig. 3 に図示する．

4 試料を通じて認められることは，グアノフラシン及び Tween 80 を洗滌剤に用いても，常法と比較して，特に細菌酵母をよく抑え，糸状菌の分離を容易にしたと思われる結果が現われていない．むしろ試料 II を用いた場合では，細菌・酵母数が，薬剤洗滌区にて滅菌水のみの常法より多量に分離されている．濃度についても必ずしも高濃度のものが効果があるともみうけられない．

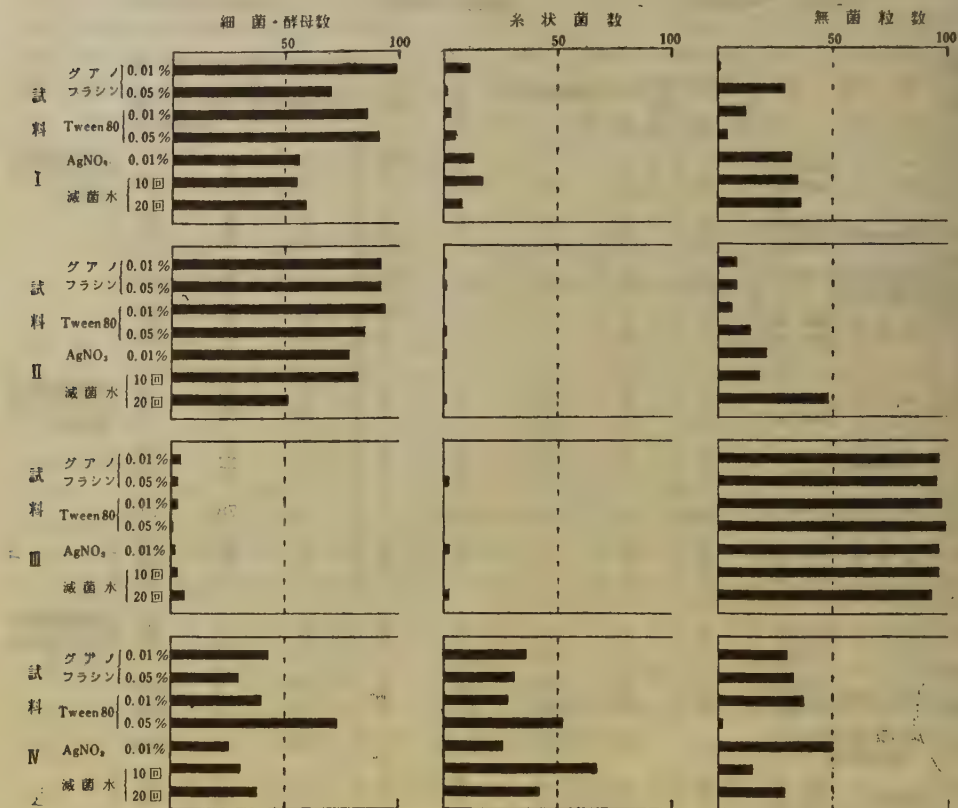



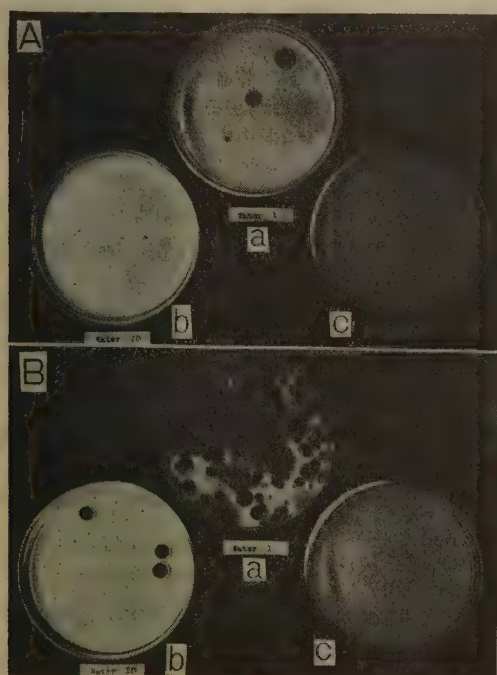
Fig. 2　グアノフラシン，Tween 80，硝酸銀を洗滌剤とした場合に出現する微生物数の比較

試料の汚染程度によつて，現われる結果が，まちまちで，特に汚染の甚しい試料(試料 I，II）などでは余計に薬剤処理の効果がはつきり出ていない．

また $AgNO_3$ 処理は本実験に関する限り前実験ほどに抑制作用が認められずかえつて常法より微生物を多量に検出する場合もあつた．なお，10回洗滌と20回洗滌との間にも多くの場合逆の結果をみている．このことは丁寧に10回洗滌すれば大体表面の微生物は除去できるもので，それ以上繰返しても大きな変化はないということが暗示されているもののようである．

このことは洗滌廃液を培養した結果からも立証できるようであつた（Fig. 3参照）

そこで更に手間をはぶくために洗滌回数を減少させる方法について引続き実験した．

Fig. 3 常法による洗滌廃液をCzapek培地に流し込み平面培養した場合の発菌状況
試料 Ⅲ（A），試料 Ⅳ（B），
最初の洗液（a），10 回目の洗液（b），
20 回目の洗液（c）

6. Tween 80 グアノフラシン 滅菌水洗滌法の組合せ実験

前述の実験では薬剤を用いて洗滌後，滅菌水で 5 回洗滌していたが，簡単にするためにそれぞれの洗滌剤のみで10回洗滌する方法，またグアノフラシン 0.05 %では効果が少ないので，濃度を高くして 0.1 %液で洗滌する方法，更に洗滌回数をなるべく少なくするために最初の 1，2回を Tween 80 で洗滌し後 9 或いは 8 回を滅菌水を用いる方法の組合せを実験した．

以上の実験には予備試験で発菌数の少ない資料（A）と多い資料（B）の 2 種を選んで供試した．結果を第18表に示す．

第18表 Tween 80-グアノフラシン-滅菌水洗滌法の組合せ

検体	担当者	洗滌方法	糸状菌				放線菌	細菌・酵母	無菌・粒数
			Penicillium	*Aspergillus*	不完全菌	計			
A（ビルマ米）	イ	常法・水（20）*	2	3	3	8	23	38	39
		グアノフラシン0.05%（10）	1	1	1	3	48	43	24
		Tween80 0.05%（10）	0	1	3	4	30	72	14
	ロ	常法・水（20）	0	1	7	8	16	43	34
		グアノフラシン0.1%＋水(5)	0	2	1	3	29	51	24
	ハ	常法・水（20）	0	2	6	8	34	39	33
		Tween80 0.05%(1)＋水(9)	1	5	6	12	33	41	23
		Tween80 0.05%(2)＋水(8)	1	5	0	6	33	46	19
B・（米国南部米）	イ	常法・水（20）	40	74	34	148	0	56	0
		グアノフラシン0.05%（10）	30	80	99	209	0	26	0
		Tween80 0.05%（10）	69	81	99	249	0	80	0
	ロ	常法・水（20）	27	100	25	152	0	53	0
		グアノフラシン0.1%(5)＋水（5）	22	79	90	191	0	46	0
	ハ	常法・水（20）	21	96	69	186	0	58	0
		Tween80 0.05%(1)＋水(9)	25	95	76	196	0	42	0
		Tween80 0.05%(2)＋水(8)	34	104	71	209	0	39	0

註 *（ ）内数字は洗滌回数：液量は 1 回 60cc を標準とする．

各区内の差異を常法と較べてみると，全般にその差は僅少であり，どの処理が有効であつたかを判定するのに困難であつた．特に濃度を高めたグアノフラシン0.1%洗滌に期待したが，これも常法と変りないが，かえつて常法による方が良好な成績を得ている．全体にみても，むしろ常法が，薬剤洗滌より無菌粒数が多く，細菌・酵母数が少なくなつていることから，必ずしも薬剤を用いる場合が良好とは考えられず，滅菌水のみの洗滌でも，十分に糸状菌検出の目的を満足する方法であるという結果が得られた．

小　結

無機殺菌剤の硝酸銀（0.1%）で表面洗滌した場合は，殺菌性が強すぎて．銀イオンの影響が残り，たとえ後に NaCl 浸漬で脱銀しても表面の雑菌を殺すにとどまらず，検出すべき糸状菌に対しても殺菌作用が及ぶものと判断された．従つて硝酸銀処理はやはり適当でない．

洗滌方法の改良で目標とするところは，なるべく洗滌回数を少なくして，十分に夾雑物，雑菌の除去できる方法を知ることにある．この際水で洗い落すことの他に弱いながらも殺菌性が加わることが理想である．この意味からグアノフラシン，Tween 80 などと滅菌水洗滌との組合せなども実験してみたが，実験毎にその結果にフレが大きく，適確な手段をもとめるに到らなかつた．

Tween 80 は最も有望と考えられたけれど，液温によつてその効果に差異が生ずるもののようで，その上，液の粘稠性により植付操作に支障を来した．この点更に温度を調節した実験が必要である．

何れにしても，滅菌水20回洗滌より優れた効果を示すものは見当らず，結局滅菌水で丁寧に洗う．この常法が現在では最良な方法という結果を得た．

実験Ⅳ　試験用培地の選択の結果並びに考察

予備試験でその微生物による汚染度を確かめておいた4点の試料を用い，次表に示す9種類の異なる条件の培地にて分離した結果を総括して第19表に示す．

第19表　選択培地に関する培養試験成績（各試料は60粒培養）

試料	培地の種類	*Penicillium* 属菌	*Aspergillus* 属菌	その他糸状菌	細菌・酵母	無菌粒	備考
I 微生物による変質の少い試料	Czapek-Dox agar (C. D. A)	1	1	2	10	46	
	Acidified　C. D. A	1	0	0	0	59	
	NaCl加用　C. D. A	0	0	2	1	57	
	Potato Dextrose agar (P. D. A)	0	0	1	10	49	
	Acidified　P. D. A	0	0	0	5	55	
	NaCl加用　P. D. A	0	0	3	0	57	
	Waksman agar　(W. A)	0	0	3	6	51	
	Acidified　W. A	1	0	1	0	58	
	NaCl加用　W. A	0	2	0	0	58	
II 特に細菌・酵母が多い試料	Czapek-Dox agar	0	2	1	58(0)	0	◎*Aspergillus*はすべて*A. glaucus* groupであつた．
	Acidified　C. D. A	0	14	3	17(15)	26	◎（　）数字は発育遅く米粒上だけに伸びているもの．
	NaCl加用　C. D. A	0	26	1	23(11)	10	
	Potato-Dextrose agar	0	0	0	60(0)	0	
	Acidified　P. D. A	3	5	6	40(18)	8	
	NaCl加用　P. D. A	0	4	0	53(0)	5	
	Waksman Agar	0	0	0	59(0)	1	
	Acidified　W. A	0	6	1	32(32)	21	
	NaCl加用　W. A	0	26	1	0	33	

試料	培地の種類	*Penicillium* 属菌	*Aspergillus* 属菌	その他糸状菌	細菌・酵母	無菌粒	備考
III 特に *Mucorales* 菌の多い試料	Czapek-Dox agar	2	9	*Rhizopus* & *Mucor* が全部をおおう.	8	—*	* *Rhizopus* 及び *Mucor*が全面をおおつて不明である.
	Acidified C. D. A	1	27		0	—	
	NaCl加用 C. D. A	0	40	5	0	15	
	Potato-Dextrose agar	2	0	同菌が全面をおおう.	6	—	
	Acidified P. D. A	3	11		1	—	
	NaCl加用 P. D. A	1	43	12	7	6	
	Waksman Agar	1	5	同菌が全面をおおう.	10	—	
	Acidified W. A	3	19		0	—	
	NaCl加用 W. A	1	29	18	2	10	
IV 細菌・酵母・糸状菌共に多い試料	Czapek-Dox agar	46	3	1	1	9	*A. glaucus*が大部分であつた.
	Acidified C. D. A	45	3	1	0	12	
	NaCl加用 C. D. A	28	23	0	0	9	
	Potato-Dextrose Agar	31	0	0	26	4	
	Acidified P. D. A	48	2	4	0	10	
	NaCl加用 P. D. A	27	25	0	0	9	
	Waksman Agar	43	5	1	4	10	
	Acidified W. A.	46	2	1	4	12	
	NaCl加用 W. A.	28	20	1	0	9	

小　結

結果を要説すると，NaCl 加用，及び酸性にした培地には，いずれも細菌・酵母の発生が比較的少なく，特に酸性培地において顕著にあらわれている．次にNaCl 加用の培地では，*Mucorales* の発育が阻止され，かつ*Aspergillus glaucus* group の糸状菌を特異的によく分離している．C. D. A., P. D. A., W. A. の間でははつきりした差が認められていないが，P. D. A がやや多くの種類の糸状菌を分離しているようである．検定に要求される培地は，特に *Aspergillus*，*Penicillium* 属菌を主体に考えているので，その目的では C. D. A., P. D. A., W. A. のいずれを選んでも支障なきものと考えられるが，検定上では特に一昼夜で培養の全面をおおつてしまう *Mucorales* 菌の発育は極力阻止すべきこと，及び細菌・酵母もできうる限り抑制したいというのが必要条件である．この条件を満足し得る培地を考えてみたが，本実験に関する限りでは見当らない．

現在検定に用いている培地は K_2HPO_4 の替りに KH_2PO_4 を用いているので培地の反応は幾分酸性（約pH5.4）となつているために細菌が比較的抑えられているが，それでもまだ十分でなく，実際に細菌によつて糸状菌が抑制されている場合が，かなり多くみうけられる．従つて検定には少なくとも本実験に用いた培地のうちで NaCl 加用と有機酸で酸性側に調節したものの２種類を併用すべきものと考える．

総　括

病変米菌の分離培養方法の改良に関する基礎的研究を実施した結果を記述する．

1　分離手技の優劣に伴う誤差の検定：同一試料からサンプリングした均一の試料を用い，常法によつて検定期日，植付順位，植付担当者を違えて培養試験を行つた場合に出現する微生物数の相異を検定した．結果は検定期日の２日ずつのずれ，植付順位の間には有意差がなく，個人別では，やや有意差が認められるようであつた．すなわち最も未熟な者がより多くの微生物を検出する傾向がみられた．然しこれらの誤差はこの検定法が実際に採用できぬ程度のものではなかつた．要するに本法を実施する技術者はなるべく習熟した者が担当すべきことを示唆している．

2　新分離用洗滌器の考案：常法では洗滌操作が煩雑で能率が悪いので，簡単な洗滌器を考案してその効果を

比較試験した．得られた結果では，洗滌器を用いた場合の方が，放線菌の出現率がやや高い傾向にあつたけれど，他の微生物については有意差が認め難かつた．すなわちこの簡易洗滌器の洗滌効果が常法（徒手洗滌）と同等の効果があることが判明した．この方法を応用すれば確かに洗滌水の交換の手数がはぶけ有利であるが，洗滌時間がそれ程短縮できぬ欠点があるので，なお攪拌手段に改善の要ありと考える．本装置は多量の植物病変組織より病菌を分離する際にも応用できる．

3　洗滌処理方法の検討：米粒の洗滌処理に表面殺菌剤，表面活性剤を洗滌剤に用い常法と比較検討した．細菌及び酵母に対して殺菌的あるいは抑制的に働いても，糸状菌に対しては影響のないものを追求していつた実験結果は次の通りである．硝酸銀（0.1～0.01%溶液）はたとえ NaCl で脱銀しても表面殺菌効果は頗る顕著で糸状菌類に対しても影響が強いので実際に用いられない．グアノフラシン乳酸塩，及び塩酸塩（0.1，0.05，0.01%溶液）は，何れも顕著な効果がみられず，洗滌回数を半分に減じた場合でも変化が認められなかつた．Tween 80（0.1，0.05，0.01%溶液）においては，20回洗滌した場合に常法より細菌，酵母がよく抑えられ，無菌粒が増加し，糸状菌数に変化のない場合があり，比較的理想に近い洗滌剤と考えられたが，例数が少なく，かつ液の粘稠性により植付操作にやや支障を招来したので，採用するにはなお一考を要する．この外グアノフラシン -Tween 80- 滅菌水を適宜組合せた実験結果からは，いずれも常法に優る結果が得られず，然も繰返えす実験毎に結果が同一傾向を示さなかつた．これは液温の相異によるものと考えられるので，液温の条件を規制した実験にて更に追試する必要がある．結果 Tween 80 を用いる場合が最も期待がもたれるので，次にどの程度洗滌回数をへらすことができるかを試験すべきである．

4　試験用培地の選択：微生物による変質程度の異なる4種の試料を用い，Czapek-Dox，Potato Dextrose，Waksman の各寒天培地及びこれらをそれぞれ酒石酸で酸性（pH 4）としたものと NaCl（7.5%）加用したものの9種類を選んで培養した．結果，*Mucorales*菌を十分に抑制しかつ細菌・酵母を適当に阻止しうる培地を検索したが，この2条件にかなう培地を決定することはできなかつた，Potato dextrose培地がやや糸状菌の検出率が高いようであるので，これを酸性としたものと，NaCl 添加したもの，2種類を少なくとも検定に用いるべきと考える．特に *Aspergillus glaucus* Group の菌種は NaCl 加用培地でないと培地上に分離できないものが多い．

本研究を遂行するに当り農業技術研究所奥野忠一技官に統計処理に関して種々御指導を頂いた．特に記して感謝の意を表する．なお本研究の一部は著者の一人倉田が米国 NRRL 研究所で実施したものであり，この間研究の便宜と指導を賜つた同研究所 A. M. Altschul, V. L. Frampton 両博士に深謝する．また終始実験に助力を惜まれなかつた橋本賢範，池谷三郎，池田峰子，河野文子の諸君に対し厚く御礼を申上げる．

Summary

Various kinds of experiments were carried on the method of isolating rice grain molds, with special regard to *Penicillium citrinum*, *Penicillium islandicum*, and *Penicillium citreo-viride*, which are causal organisms of the toxic yellow rice imported from many foreign countries. The original isolating method consisted of two parts, i. e., repeated washings of rice grains in sterilized distilled water until the water free from microorganisms and planting the washed rice grains to test tubes containing Czapek's solution agar. The summary of the experiments which modify this original method was as follows:

(1) A little deviation was observed in the number of microorganisms detected by each indivisual through the washing and planting techniques, with general trend that unskilled persons gave more microorganisms. Although the deviation was not of significance, the result indicated the necessity of skilled persons.

(2) A new washing apparatus was made (Fig. 1.) The use of this apparatus saved time and labor, although it gave a little more Actinomyces. This apparatus may be usefull in the field of plant pathology.

(3) Instead of distilled water, some germicidal solution were tested. Silver nitrate (0.1～0.01%) was too strong to the isolation of rice grain molds. Guanofuracin lactate and hydrochloride (0.1, 0.05, and 0.001%) were not effective. The use of Tween 80 (0.1, 0.05, and 0.01%) reduced the number of ba-

cteria and yeast, with no effect on the number of fungi detected, but some difficulties were experienced in the planting process because of the viscous nature of this solution.

(4) Experiments were done on the effect of media on the kind and number of microorganisms using 9 media, i. e., Czapek's solution agar, potato dextrose agar, Waksman, and 7.5 % NaCl added and acidified for each medium, in order to find out the suitable media which inhibit the growth of bacteria, yeast, and *Mucorales*.

Results indicated that the acidified media were quite effective for eliminating bacteria, though it was good media for *Mucorales* but not good for *Aspergillus glaucus* group. 7.5 % NaCl added media were good in reducing the number of bacteria and *Mucorales* and very good for *Aspergillus glaucus* group, but the number of other *Aspergillus* and *Penicillium* spp. were reduced. No significant difference was observed within Czapek's solution agar, potato dextrose agar, and Waksman's. It will be necessary to use 7.5 % NaCl added and acidified media for detecting rice grain molds.

Received June 18, 1957.

熱帯産有用植物目録

昭和 32 年

宮崎幸男

List of Tropical Useful Plants

1957

Izu Experiment Station of Medicinal Plants
National Hygienic Laboratory
155, Shimokamo, Minamiizu-Machi, Kamo-Gun, Shizuoka-Ken, Japan

Yukio MIYAZAKI

This list contains tropical and subtropical useful plants which are growing in the greenhouse, as of June 1, 1957. Some of the plants have been found to winter outdoors at the Experiment Station.

The scientific names of the plants were derived from the following books:

Bailey, L. H. : The Standard Cyclopedia of Horticulture, 1925.
Brown, W. H. : Minor Products of Philippine Forests, 1921.
Ewart, A. J. : Flora of Victoria, 1930.
Heyne, K. : De Nuttige Planten van Nederlandsch Indië, 1927.
Honda, M. : Nomina Plantarum Japonicarum, 1939.
Kirtikar, K. R. and Basu, B. D. : Indian Medicinal Plants, 1918.
Ridley, H. N. : The Flora of the Malay Peninsula, 1922.

GYMNOSPERMAE 裸子植物亜門

Cycadaceae ソテツ科

Macrozamia spiralis Miq.

Gnetaceae グネツム科

Gnetum indicum Merr. イソドグネツム

Pinaceae マツ科

Agathis alba Foxw. マニラコパール
— *australis* Salisb. カウリコパール
Araucaria braziliana A. Rich. パラナマツ

ANGIOSPERMAE 被子植物亜門

DICOTYLEDONEAE 雙子葉植物綱

Acanthaceae キツネノマゴ科

Andrographis paniculata Nees. サンピロート

Anacardiaceae ウルシ科

Anacardium occidentale L. カシュー
Dracontomelum edule Skeels.
Mangifera indica L. マンゴー
Schinus Molle L. コショウノキ
Semecarpus Anacardium L. f.

Anonaceae バンレイシ科

Anona Cherimola Mill. チェリモヤ
— *muricata* L. トゲバンレイシ
— *reticulata* L. ギュウシンリ
— *squamosa* L. バンレイシ
Artabotrys odoratissimus R. Br. オウソウカ
Canangium odoratum Baill. イランイラン

Apocynaceae キョウチクトウ科

Acocanthera spectabilis G. Don.
Allamanda cathartica L. var. *Hendersonii* Raffl.
— — var. *Williamsii* Hort.
Alstonia scholaris R. Br.
Alyxia sinensis Champ.
Aspidosperma Quebracho-blanco Schlecht. ケブラチョウ
Carissa carandas L. カリッサ

Holarrhena antidysenterica Wall.
Meladinos suaveolens Champ.
Plumeria acutifolia Poir. インドソケイ
— *rubra* L. インドソケイ
Rauwolfia caffra Sond.
— *serpentina* Benth. インドジャボク
— *verticillata* Baill.
Strophanthus divaricatus Hook. et Arn. ストロファンツス
— *gratus* Franch. ストロファンツス
— *hispidus* DC. ストロファンツス
— *Kombe* Oliv. ストロファンツス
— *sarmentosus* DC. ストロファンツス
— *speciosus* Reber ストロファンツス
Thevetia nereifolia Juss. キバナキョウチクトウ
— *peruviana* Schum.
Wrightia annamensis Eberh. et Dub.

Aquifoliaceae モチノキ科

Ilex paraguariensis St. Hil. マテチャ

Araliaceae ウコギ科

Tetrapanax papyriferum K. Koch. ツウダツボク

Aristolochiaceae ウマノスズクサ科

Aristolochia elegans Mast.
— *Tagala* Cham.

Asclepiadaceae ガガイモ科

Asclepias curassavica L. トウワタ
Gomphocarpus fruticosus
Hemidesmus indicus R. Br.

Bignoniaceae ノウゼンカズラ科

Kigelia pinnata DC. ソーセージノキ
Oroxylum indicum Vent.
Parmentiera cerifera Seem. ロウソクノキ
Spathodea campanulata Beauv. カエンボク
Tecomaria capensis Seem. ヒメノウゼンカズラ

Bixaceae ベニノキ科

Bixa Orellana L. ベニノキ

Bombacaceae キワタ科

Bombax malabaricum DC. ワタノキ
Chorisia speciosa St. Hil.
Durio zibethinus L. ドリアン
Eriodendron anfractuosum DC. カポック
Ochroma Lagopus Swartz バルサ
Pachira macrocarpa Schlecht.

Burseraceae カンラン科

Canarium commune L. カナリアノキ

Caricaceae チチウリノキ科

Carica Papaya L. パパイヤ

Casuarinaceae トキワギョリュウ科

Casuarina equisetifolia Forst. トキワギョリュウ
— *sumatrana* Jungh.
— *torulosa* Dry.

Chloranthaceae チャラン科

Chloranthus spicatus Makino チャラン

Clusiaceae テリハボク科

Calophyllum inophyllum L. テリハボク
Garcinia Loureirii Pierre
— *mangostana* L. マンゴスチン
— *oblongifolia* Champ.
— *xanthochymus* Hook f. タマゴノキ

Combretaceae シクンシ科

Anogeissus leiocarpus Guill. et Perr.
Quisqualis indica L. インドシクンシ
— — var. *villosa* Clarke シクンシ
Terminalia Bellerica Roxbg. ミロバラン
— *Chebula* Retz. ミロバラン

Convolvulaceae ヒルガオ科

Ipomoea digitata L.
— *reputans* Poir. カンコン

Crassulaceae ベンケイソウ科

Bryophyllum calycinum Salisb. セイロンベンケイ
— *daigremontianum* Berger.
— *tubiflorum* Harw.

Cucurbitaceae ウリ科

Citrullus Colocynthis Schrad. コロシント

Daphnacaceae ジンチョウゲ科

Dais cotinifolia L.

Dilleniaceae サルナシ科

Dillenia ovata Wall.

Dipterocarpaceae フタバガキ科

Dialium cochinchinensis Pierre
Hopea odorata Roxb.
Shorea cochinchinensis Pierre

Ehretiaceae ムラサキ科

Heliotropium grandiflorum Don. ヘリオトロープ
— *peruvianum* L. ヘリオトロープ

Erythroxylaceae コカ科

Erythroxylon Coca Lam. コカ
— *Lucidum*
—*novogranatense* Hieron. コカ

Euphorbiaceae タカトウダイ科

Antidesma bunius Spreng.
Bischofia trifoliata Hook. アカギ
Bridelia monoica Merr.
Euphorbia splendens Bojer. ハナキリン
— *Tirucalli* L. ミドリサンゴ
Excoecaria cochinchinensis Lour. セイシボク
Hevea brasiliensis Muell. Arg. パラゴムノキ
Hura crepitans L.
Jatropha Curcas L. ナンヨウアブラギリ
— *podagrica* Hook.
Mallotus philippinensis Muell. Arg. クスノハガシワ
Manihot Graziovii Muell. Arg. マニホットゴムノキ
— *utilissimaa* Pohl. キャッサバ
Pedilanthus tithymaloides Poit. var. *variegatus* Hort.
Phyllanthus Emblica L. ユカン
— *grandifolius* L.
— *nivosus* Bull. var. *roseo-pictus* Hort. セイヨウコバンノキ
— *pectinatus* Hook. f.

Fagaceae ブナ科

Quercus suber L. コルクガシ

Flacourtiaceae イイギリ科

Hydnocarpus anthelmintica Pierre ダイフウシ
— *Kurzii* Warb. チャウルムグラ

Geraniaceae フウロソウ科

Pelargonium denticulatum Jacq.
— *graveolens* L'Her.
— *odoratissimum* Ait.
— *quercifolium* Ait.
— *Radula* L'Her.

Lamiaceae ヲドリコソウ科

Ocimum basilicum L. メボウキ
— *gratissimum* L. インドメボウキ
— *sanctum* L.
Orthosiphon stamineus Benth. クミスクチン
Pogostemon Cablin Benth. パチョリー
— *heyneanus* Benth. パチョリー

Lauraceae クス科

Cinnamomum camphora Sieb. var. *linaloolifera* Fujita ホウショウ
— *zeylanicum* Nees. セイロンニッケイ
Persea americana Mill. アボカド

Loganiaceae フジウツギ科

Buddleia madagascariensis Lam. アフリカフジウツギ
Strychnos angustiflora Benth.
— *Nux-vomica* L. マチン
— *ovalifolia* Wall.

Lythraceae ミソハギ科

Lagestroemia Flos-Reginae Reiz. オウバナサルスベリ
Lawsonia inermis L. ツマクレナイノキ

Malvaceae アオイ科

Hibiscus elatus Swartz
— *Rosa-sinensis* L. ブッソウゲ
— *Sabdariffa* L. ローゼル
— *tiliaceus* L. ヤマアサ
Sida veronicaefolia Lam.
Urena lobata L.

Melastomaceae ノボタン科

Memecylon edule Roxb.

Meliaceae センダン科

Cedrela mexicana Roem.
— *odorata* L.
Melia Azedarach L. タイワンセンダン
Swietenia macrophylla King オウバマホガニー
— *Mahogani* Jacq. マホガニー
Toona Calantas Merr. et Rolfe

Menispermaceae ツズラフジ科

Cissamperos Pareira L.
Cocculus laurifolius DC. コウシュウウヤク
Stephania cepharantha Hayata タマサキツズラフジ
— *Sasakii* Hayata コウトウツズラフジ

Moraceae クワ科

Artocarpus hypargyraea Hance
— *incisa* L. f. パンノキ
— *integrifolia* L. f. パラミツ
Broussonetia papyrifera Vent.
Ficus capensis
— *elastica* Roxbg. インドゴムノキ
— — var. *variegata* Hort. フイリインドゴムノキ
— *retusa* L. ガジュマル

Moringaceae ワサビノキ科

Moringa oleifera Lam. ワサビノキ

Myoporaceae ハマジンチョウ科

Myoporum platycarpum R. Br.

Myristicaceae ニクズク科

Myristica fragrans Houtt. ニクズク

Myrtaceae テンニンカ科

Barringtonia acutangula Gaertn.

Callistemon linearis DC.

— *rigidus* R. Br.

Eucalyptus citriodora Hook. レモンユーカリ

— *globulus* Labill. グロブルスユーカリ

— *marginata* Smith マルギナータユーカリ

— *robusta* Smith ロブスタユーカリ

Eugenia aquea Burm. ミズレンブ

— *caryophyllata* Thunb. チョウジ

— *Jambos* L. フトモモ

Leptospermum citratum Challinor, Cheel et Penfold

— *lanigerum* Smith

Melaleuca ericifolia Smith

— *hypericifolia* Smith

— *Leucadendron* L. カユプテ

— *thymifolia* Smith

Myrtus communis L. マートル

— — var. *tarentina* Mill.

Psidium cattleianum Sabine ストロベリーグァバ

— *Guajava* L. バンジロウ

Tristania laurina R. Br.

Oleaceae モクセイ科

Jasminum gracillimum Hook. f. ボルネオソケイ

— *grandiflorum* L. タイワンソケイ

— *nudiflorum* Lindl.

— *odoratissimum* L. キソケイ

— *Sambac* Aiton マツリカ

Oxalidaceae カタバミ科

Averrhoa Bilimbi L. ビリンビ

— *Carambola* L. ゴレンシ

Papilionaceae マメ科

Abrus precatorius L. トウアズキ

Acacia arabica Willd. アラビアゴムモドキ

— *Baileyana* F. v. M. ギンバアカシア

— *Catechu* Willd. ペグアセンヤク

— *confusa* Merr. ソウシジュ

— *cyanophylla* Lindl.

— *dealbata* Link.

— *decurrens* Willd.

— *Farnesiana* Willd. キンゴウカン

— *lunata* Sieb.

— *mollissima* Willd.

Acacia Senegal Willd. アラビアゴムノキ

Adenanthera pavonia L. ナンバンアカアズキ

Albizzia Lebbek Benth. ビルマネム

Bauhinia alba Buch-Ham.

— *glauca* Wall.

— *purpurea* L.

Caesalpinia Bonducella Flem. シロツブ

— *Nuga* Ait. ナンテンカズラ

— *pulcherrima* Swartz.

— *Sappan* L. スホウボク

— *vernalis* Champ.

Calopogonium mucunoides Desv.

Cassia alata L. ハネセンナ

— *australis* Sims. var. revoluta Benth.

— *eremophila* A. Cunn.

— *Fistula* L. ナンバンサイカチ

— *grandis* L.

— *nodosa* Ham.

— *siamea* Lam. タガヤサン

— *Sophora* L.

— *surratensis* Burm. f.

Ceratonia Siliqua L. イナゴマメ

Clitoria Ternatea L.

Delonix regia Rafin. ホウオウボク

Derris elliptica Benth. デリス

— *malaccensis* Prain. デリス

— *microphylla* Val. デリス

— *sinuata* Benth. デリス

Desmodium gyrans DC. マイハギ

Enterolobium Timbouva Mart.

Erythrina indica Lam.

Erythrophloeum guineense G. Don.

Glirricidia maculata HBK.

Haematoxylon campechianum L. ロッグウッド

Indigofera tinctoria L.

Leucaena glauca Benth. ギンゴウカン

Milletaria taiwaniana Hayata ドクフジ

Milletia caffra Meissn.

Mimosa pudica L. オジギソウ

— *rubicaulis* Lam.

— *Spegazzinii* Pirotta.

Mucuna pruriens DC.

Myroxylon Pereirae Klotzsch ペルーバルサムノキ

Ormosia emarginata Benth.

Oxylobium ellipticum R. Br.

Peltophorum ferrugineum Benth.
Pithecolobium Saman Benth. アメリカネムノキ
Prosopis africana
— *juliflora* DC.
Pterocarpus Cambodianus Pierre
— *indicus* Willd. インドシタン
— *vidalianus* Rolfe
Pteroloma triquetrum Benth.
Sophora chrysophylla Seem.
Tamarindus indica L. タマリンド
Tephrosia purpurea Pers.

Passifloraceae トケイソウ科

Passiflora edulis Sims. クダモノトケイソウ

Piperaceae コショウ科

Piper nigrum L. コショウ

Plumbaginaceae イソマツ科

Planbago capensis Thunb. ルリマツリ

Proteaceae ヤマモガシ科

Banksia serrata L.
Grevillea robusta Cunn. キヌガシ
— — var. *Forsteri* キヌガシ
Macadamia ternifolia F. Muell. クィーンスランドナット

Rhamnaceae クロウメモドキ科

Zizyphus Jujuba Lam. インドナツメ
— *Spina-Christi* Willd.

Rosaceae バラ科

Chrysobalanus Icaco L. イカコ

Rubiaceae アカネ科

Cinchona succirubra Pav. キナ
Coffea arabica L. コーヒーノキ
— — var. *Ramon* コーヒーノキ
— *bengalensis* Roxbg. コーヒーノキ
— *excelsa* A. Chev. コーヒーノキ
— *Laurentii* De Willd. コーヒーノキ
— *liberica* Ball. コーヒーノキ
— *robusta* Hort. コーヒーノキ
Ixora chinensis Lam. サンタンカ
Manettia glabra Cham. et Schlecht. カエンソウ
Psychotria rubra Poir.
— *serpens* L.
Uragoga Ipecacuanha Baill. トコン
Xanthoxylon Avicennae DC.

Rutaceae ヘンルウダ科

Aegle Marmelos Correa マルメロ
Citrus bergamia Risso et Poiteau ベルガモット
Murraya exotica L. ゲッキツ
Pilocarpus pennatifolius Lam. ヤボランジ
Severinia buxifolia Ten.

Santalaceae ビャクダン科

Santalum album L. ビャクダン

Sapindaceae ムクロジ科

Dodonaea viscosa L.
Euphoria Longana Lam. リュウガン
Litch chinensis Sonn. レイシ
Nephelium lappaceum L. ランブタン
Sapindus Saponaria L.
Schleichera trijuga Willd.

Sapotaceae クロテツ科

Achras Sapota L. サポジラ
Mimusops Elengi L.

Saxifragaceae ユキノシタ科

Dichroa febrifuga Lour. ジョウザン

Simarubaceae ニガキ科

Ailanthus excelsa Roxb.

Solanaceae ナスビ科

Brunfelsia americana L. アメリカバンマツリ
Cestrum aurantiacum Lindl.
— *nocturnum* L. ヤコウボク
Cyphomandra betaceae Sendt. ツリートマト
Datura fastuosa L.
— *suaveolens* Humb. et Bonpl.
Solandra grandiflora Sw.

Sterculiaceae アオギリ科

Brachychiton populneum R. Br.
Cola acuminata Schott et Endl. コラ
Sterculia nobilis R. Br. ピンポン
Tarrietia cochinchinensis Pierre
Theobroma Cacao L. カカオ

Styracaceae エゴノキ科

Styrax Benzoin Dry. アンソクコウノキ

Tiliaceae シナノキ科

Elaeocarpus serratus L. セイロンオリーブ

Verbenaceae クマツヅラ科

Lantana Camara L. シチヘンゲ
— *Sellowiana* Link et Otto コバノシチヘンゲ
Lippia citriodora Kunth. コウスイボク
Tectona grandis L. チーク
Vitex Agnus-castus L. セイヨウニンジンボク
— *Negundo* L.

Zygophyllaceae ハマビシ科

Guaiacum officinale L. ユソウボク

MONOCOTYLEDONEAE 単子葉植物綱

Amaryllidaceae ヒガンバナ科

Agave ferox Koch.

Crinum latifolium L. インドハマユウ

Frucraea gigantea Vent. モウリシアスヘンプ

Araceae テンナンショウ科

Amorphophallus Rivieri Dur.

Dieffenbachia Seguine Schott. var. *nobilis* Engler

Monstera deliciosa Liebm. ホウライショウ

Bromeliaceae アナナス科

Ananas comosus Merr. パインアップル

Commelinaceae ツユクサ科

Rhoeo discolor Hance ムラサキオモト

— — var. *vittata* Hook. フイリムラサキオモト

Zebrina pendula Schnizl. ハカタガラクサ

Cannaceae ダンドク科

Canna edulis Ker. ショクヨウカンナ

Coryphaceae シュロ科

Areca Catechu L. ビンロウ

— *triandra* Roxbg.

Arenga saccharifera Labill. サトウヤシ

Borassus flabellifer L.

Caryota urens L. クジャクヤシ

Cocos nucifera L. ココヤシ

Elaeis guineensis R. Br. アブラヤシ

Livistonia chinensis R. Br. ビロウ

Phoenix dactylifera L. ナツメヤシ

— *sylvestris* Roxbg.

Cyclanthaceae パナマソウ科

Carludovica palmata Ruiz. et Pav. パナマソウ

Cyperaceae カヤツリグサ科

Cyperus Papyrus L. カミカヤツリ

Dioscoreaceae ヤマノイモ科

Dioscorea bulbifera L.

Dracaenaceae リュウケッジュ科

Cordyline terminalis Kunth. センネンボク

Dracaena Draco L. リュウケッジュ

Liliaceae ユリ科

Aloe arborescens Mill. var. *natalensis* Berger キダチロカイ

— *ferox* Mill.

— *Hanburiana* Naudin

— *saponaria* Haw. シャボンロカイ

— *vera* L. var. *chinensis* Mill. トウロカイ

Marantaceae クズウコン科

Maranta arundinacea L. アロールート

Musaceae バショウ科

Musa cavendishii Lam. サンジャクバナナ

— *minor* Nakai キングバナナ

— *sapientum* L. バナナ

— *textilis* Nee マニラアサ

Orchidaceae ラン科

Vanilla planifolia Andr. ヴァニラ

Poaceae イネ科

Cymbopogon citratus Stapf レモングラス

— *exaltatus* Domin

— *flexuosus* Stapf マラバールグラス

— *Winterianus* Jowitt シトロネラ

Vetiveria zizanioides Stapf ベチベル

Zingiberaceae ショウガ科

Alpinia calcarata Rosc.

— *chinensis* Rosc. アオノクマタケラン

— *Galanga* Sw.

— *speciosa* K. Schum. ゲットウ

Amomum amarum ヤクチ

Curcuma longa L. ウコン

— *zedoaria* Rosc. ガジュツ

Elettaria Cardamomum Maton カルダモン

Hedycium spicatum Ham. サンナ

Zingiber Zerumbet Smith ハナショウガ

輸入食品の人工着色料について

川城　巖，川田公平，細貝祐太郎

On the Artificial Color in Imported Foods.

Iwao KAWASHIRO, Kōhei KAWATA, and Yūtarō HOSOGAI

まえがき　人工着色料については昔からしばしば衛生検査の対象となつたが，これらはいずれも国内品が多く外国製品についてはあまり調査されていない．われわれは昭和30年度以降輸入検査品として試験を行つた飴菓子等の着色食品についてその結果を報告する．

検査方法　1．常法のごとく着色料を検体から毛糸染色法で抽出した後，沪紙クロマトグラフィーで着色料を各族に分類し[1]さらに衛生試験法[2]の沪紙法及び化学試薬による呈色反応を行い判定した．2. 前記の方法によつてもRf値が極めて接近し判定がやや困難な場合は，可視部吸収スペクトルの測定及び還元成績体の沪紙クロマトグラフィー[4]を併せ行い前記1の結果と総合的に判定した．なおいずれの場合も精製した色素を対照として使用した．

検査結果

Table 1.　Artificial Color in Imported Foods.

No.	Sample	Color	Idetification of Color
1	Edam Cheese	Red	Ponceau 3R (R1)
2	Life Sauer Drops	Red	Amaranth (R2), Sunset Yellow (Y5)
		Yellow	Tartrazine (Y4)
		Orange	Tartrazine (Y4), Amaranth (R2)
		Green	Brilliant Blue (B1), Tartrazine (Y4)
3	Rolls Fruito Drops	Red	Amaranth (R2), Sunset Yellow (Y5)
		Yellow	Tartrazine (Y4)
		Orange	Sunset Yellow (Y5), Amaranth (R2)
		Green	Brilliant Blue (B1), Tartrazine (Y4)
		Violet	Amaranth (R2), Brilliant Blue (B1)
4	Chocolate Beans	Red	New Coccine (R102)
		Yellow	Sunset Yellow (Y5), Tartrazine (Y4)
		Orange	Sunset Yellow (Y5), New Coccine (R102)
		Green	Brilliant Blue (B1), Tartrazine (Y4)
5	Kompeito Okinawa	Red	Phroxine (R104), Amaranth (R2)
		Yellow	Tartrazine (Y4)
		Green	Brilliant Blue (B1), Tartrazine (Y4)
6	Okinawa Drops	Red	Amaranth (R2)
		Yellow	Tartrazine (Y4)
		Orange	Orange 1 (O1), Sunset Yellow (Y5)
7	Sirop De Grenadine	Red	New Coccine (102)
8	Edam Cheese	Red	Amaranth (R2)
9	Fruito Cokteil	Red	Erythrosine (R3)
10	Fruito for Salad	Red	Erythrosine (R3)
11	Fruito Bonbon	Red	New Coccine (R102), Tartrazine (Y4)

		Yellow	Tartrazine (Y4)
		Orange	New Coccine (R102), Sunset Yellow (Y5), Tartrazine (Y4)
		Pink	Amaranth (R2), Sunset Yellow (Y5), Tartrazine (Y4)
12	Honey Bonbon	Brown	Amaranth (R2), Tartrazine (Y4), Sunset Yellow (Y5)
13	Melt Bonbon	Orange	Sunset Yellow (Y5), Tartrazine (Y4)
14	Fruito Candy	Red	Amaranth (R2)
		Yellow	Tartrazine (Y4)
		Orange	Sunset Yellow (Y5), Amaranth (R2)
		Green	Brilliant Blue (B1), Tartrazine (Y4)
		Violet	Amaranth (R2), Brilliant Blue (B1)
15	Navy Fruito	Red	Amaranth (R2)
		Yellow	Tartrazine (Y4)
		Orange	Tartrazine (Y4), Amaranth (R2)
		Green	Brilliant Blue (B1), Tartrazine (Y4)
		Violet	Amaranth (R2), Tartrazine (Y4)
16	Navy Orange Drops	Orange	Amaranth (R2), Tartrazine (Y4)
		Yellow	Tartrazine (Y4)
17	Fruito Salad	Red	Amaranth (R1), Tartrazine (Y4)
		Green	Blilliant Blue (B1), Tartrazine (Y4)
		Violet	Amaranth (R2), Tartrazine (Y4), Indigo Carmine (B2)
18	Court Fruit Drops	Red	Amaranth (R2)
		Orange	Sunset Yellow (Y5)
		Violet	Blilliant Blue (B1), Amaranth (R2)
19	Fruit Barley Sugar	Red	Amaranth (R2)
		Yellow	Tartrazine (Y4)
		Violet	Amaranth (R2), Blilliant Blue (B1)
		Green	Blilliant Blue (B1), Tartrazine (Y4)
20	Lemon Drops	Yellow	Tartrazine (Y4)
21	Mixed Fruit Drops	Red	Amaranth (R2), Tartrazine (Y4)
		Green	Blilliant Blue (B1), Tartrazine (Y4)
		Orange	Amaranth (R2), Tartrazine (Y4)
		Yellow	Tartrazine (Y4)
22	Orange Drops	Orange	Amaranth (R2), Tartrazine (Y4)
23	Golden Butter Mints	Yellow	Tartrazine (Y4)
24	Intorun Assortment	Orange	Sunset Yellow (Y5)
25	Fruit Stroberry	Red	Amaranth (R2), Tartrazine (Y4)
26	Bonbon Raspberry	Red	Amaranth (R2)
27	Bonbon Lemon	Yellow	Tartrazine (Y4)
28	Fruit Lollies	Violet	Blilliant Blue (B1), Amaranth (R2), Ponceau 3R (R1)
		Red	Amaranth (R2)
		Orange	Sunset Yellow (Y5)
29	Stroberry Jam	Red	New Coccine (R102)
30	Table Jellies	Red	Azorubine
31	Chocolate Cetred Mints	Yellow	Chlocein Orange

32	Licorice Jangoes	Orange	Chlocein Orange
33	Fruit Jangoes	Orange	Chlocein Orange
		Red	Azorubine, Chlicein Orange
34	Paradies Fruits	Red	Azorubine
		Orange	Chlocein Orange
35	Paradies Drops	Red	Azorubine
		Orange	Chlocein Orange
36	Fruits Candies	Pink	Azorubine
37	Double Fruit	Red	Amaranth（R2），Sunset Yellow（Y5）
		Yellow	Tartrazine（Y4）
		Green	Blilliant Blue（B1），Tartrazine（Y4）
38	Instant Pudding Assorted Flavours		
	(Vanilla)	Yellow	Tartrazine（Y4），Sunset Yellow（Y5）
	(Strowberry)	Red	Sunset Yellow（Y5），Rhodamine
	(Raspberry)	Red	Rhodamine
39	Drydex Strawberry Flavour		
		Red	Amaranth（R2）
40	Edam Cheese	Red	Sudan 3

註 カッコ中のY, R, O, B はそれぞれ黄色，赤色，だいだい色及び青色を，またこれらの次の数字は食用許可色素の許可番号を示す．

考察 以上の結果よりみて食品の着色に多く使用されるものは，アゾ色素が最も多かつたが2，3の検体に使用されたものは着色料の純度が低いためか副色素の存在が認められた．これは着色料の製造工程中に於て低純度の原料（特にカップリング成分のナフタリンスルフォン酸類）を使用した場合副生されるものである．また2，3の国の製品から我国では不許可の着色料が検出されたが，これは各国々によつて許可色素が若干異つているためであり[3]，輸出国ではいずれも許可色素である．終りに，御指導を賜つた藤井清次博士に感謝する．

文　　献

1） 藤井：本誌，73，366（1955）．
2） 衛生試験法（1955）．
3） 吉本：食品衛生研究，3，57（1957）．
4） 藤井・神蔵・細貝：本誌，75（1957）．

Summary

We determined the Artificial Color in Imported Foods. Permited Food Colors obtained thus are as follows :

Total sample………40

Permited Food Color in japan	31 Samples
Non Permited Food Color in japans	9 Samples

Received June 18, 1957

繊維素グリコール酸ナトリウムの置換度の測定法について

藤 井 清 次, 原 田 基 夫

On the Determination of the Degree of Substitution of Sodium Carboxymethylcellulose

Seiji Fujii and Moto-o Harada

まえがき　Carboxy Methyl Cellulose はアルカリ繊維素にモノクロル酢酸を作用させるときに生ずる水溶性の高粘性物質である．本品の Na 塩は食品添加物[1] として許可され，増粘剤として 2 %まで使用を認められている．普通は Na-CMC あるいは単に CMC と略称し，遊離のものは CMC 酸あるいは H-CMC と呼ばれている．(以下それぞれの略称に従う)，Na-CMC の製法に関する報告は多数[2~7] あるが，原理はいずれも同じである．また Na-CMC の構造式[8]は第1図の如く考えられているが，繊維素分子中においてその構造単位である無水葡萄糖の第一級アルコール基及び第二級アルコール基に結合する Sodium carboxymethyl group ($Na-O_2C-CH_2$) は一定していない[9]，従つてこの1葡萄糖単位に対する Carboxymethyl 基の数，すなわち Ether 化度 (Degree of Substitution＝D. S.) は一般に平均値で表わしている．Na-CMC 製品は白色～類白色，無味無臭，吸湿性の粉末～綿状である．水にとけて粘稠な溶液となり，従来の天然糊料に比較して優れた性質を持つている．

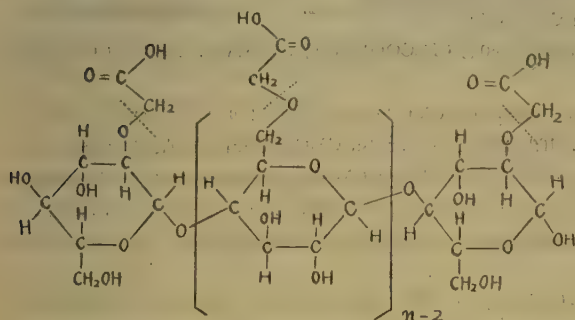



Fig. 1　Idealized Structure of a Carboxymethylcellulose Molecule

従つて Na-CMC の理化学的性質及びその利用に関して多数の報告[10~18] が寄せられている．我が国においても最近需要が増大し食品工業方面に濃化剤，結合剤等として盛んに利用されている．しかしNa-CMC が食品に添加された場合の検出及び定量法に関する報告[19]は極めて少ない．更に増量偽和等の目的で許容限度以上に添加される場合を考えると，食品中の定性定量法の確立が要望される．本品の定量にあたつて最も困難を感じるところは，定量値を決定する重要因子たる D. S. が製造条件によつて左右されるため，製品の D. S. が一定しない点である．しかも特異反応がないことも大きな障碍となつている．従つて現在 Na-CMC の構成々分，あるいは加水分解物を間接に定量する方法を用いている状態である．著者らは食品中の定性及び定量法を確立するための基礎実験として，従来報告されている種々の方法を用いて Na-CMC 製品の D. S. を測定し，それらの結果について比較検討した．

実 験 の 部

1，　エーテル化度測定法に関する従来の研究とその検討　エーテル化度の測定法を分類すれば第1表の如くに

Table 1.　Various Methods for determining Degree of Substitution

A. Acid-Methanol Method	—Acid-Wash Method[20]
	—H_2SO_4-Methanol Method[21]
B. Ash-Alkalinity Method	
C. Metal Salts Method	—Copper Salt Method[2)22)23]
	——Uranyl Method[24]

D. Colorimetric Method………Naphthalenediol Method[20)25)]

E. Electrometric Titration Method—
- —Potentiometric Titration Method[2)26)27)28)]
- —Conductometric Titration Method[2)20)]

なる．此等の中，比較的多く使用されている方法は硫酸メタノール法，灰分アルカリ度法，銅塩沈澱法及び比色法である．著者らは此等の方法を追試し一部に改良を加えた．またアンスロン法[28)]はエーテル化度の測定には用いられていないが，Na-CMC の定量にしばしば使用されるのでこの方法についても検討を行つた．なお測定法に関する詳細は原報を参照されたい．

A 硫酸メタノール法 **（1） 操作法**　Na-CMC の無水物約 0.5～1.0g を精秤し，N/10 硫酸溶液 30～60cc を精確に加え 5～15 時間放置後，メタノール濃度約 80%以上となるように純メタノールを加えて CMC 酸を完全に沈澱させたのち，ガラスフイルターを用いて吸引沪過し残渣を 80%メタノールで洗滌する．沪液及び洗液をメチルレッドを指示薬として過剰の硫酸をN/10 水酸化ナトリウム液で滴定し，消費された硫酸量を求めこれに遊離アルカリ度（＋）または酸度（－）の補正* を行つて，実際に Na-CMC に消費された N/10 硫酸量から D. S. を算出する．また沈澱したCMC酸を過剰のアルカリで溶かし，硫酸で逆滴定する場合もある．一般に前者を**沪液法**後者を**残渣法**と呼んでいる．また塩酸あるいは硝酸々性メタノールで処理したCMC酸の一定量をとつて残渣法の如く操作する方法もある．これを**酸洗滌法**と呼んでいる．

（2） 計算法 （a） 沪液法

$$\frac{\text{N/10 硫酸使用数} - \text{N/10 水酸化ナトリウム消費数}}{\text{無水Na-CMCのg数}} - \begin{matrix}\text{遊離アルカリ度}(+)\\\text{または酸度}(-)\end{matrix} = A \qquad D.S. = 162A/10000 - 80A$$

（b） 残渣法及び酸洗滌法

$$\frac{\text{N/10水酸化ナトリウム使用数} - \text{N/10硫酸消費数}}{\text{無水 Na-CMCのg数}} = A \qquad D.S. = 162A/10000 - 58A$$

但し，162 は繊維素の基本葡萄糖分子の分子量の概数，80 は CH_2COONa の分子量の概数，58はCH_2COOH の分子量の概数．

（3） 硫酸メタノール法の検討　沪液法において無水 Na-CMC 1g 中の結合ナトリウムを中和するに要した N/10硫酸液のcc 数を x とすれば x＝10000D. S. /162＋80D. S. 従つて Na-CMCを分解するに消費した酸量とエーテル化度を予め作図すれば，その都度計算しないですむ．また粗製Na-CMC には多量の未反応あるいは副反応物質を含有する．すなわち遊離アルカリ，食塩，グリコール酸等であるが，食塩，グリコール酸ソーダは硫酸と反応してそれぞれ当量の酸を再生するから，単に遊離アルカリの補正を行えば上述の沪液法を使用することが出来る．

B 灰分アルカリ度法

（1） 操作法　Na-CMC の無水物約 0.5～1.0g を精秤し約 500° で灰化したのち，温水を用いて全可溶分を浸出し，浸出液に N/10 硫酸液 30～60cc を加えて酸性となし，煮沸してCO_2 を追い出し冷却したのちフェノールフタレインを指示薬として過剰の酸を N/10 水酸化ナトリウム液で逆滴定し，消費された酸量を求め補正を行つて D. S. を算出する．計算法はAと同様である．

（2） 灰分アルカリ度法の検討　Na-CMC の D. S. の測定法としては最もかんたんであり，Aと同様盛んに利用される．Na-CMC 中の結合 Na%＝2300D. S. /162＋80D. S. または D. S. ＝ 162Na/2300－80Na で与えられ従つて結合%とD. S. との関係を予め作図しておけば便利である．

C 銅塩沈澱法

（1） 操作法　Na-CMC 約 0.25g を秤量ビンにとり 100～105° に 2～3 hrs. 乾燥し，デシケータ中に放冷したのち精秤し，Na-CMC を 100cc コニカルビーカに移し再び秤量ビンを精秤しその差を試料の量とする．Na-CMC は無水メタノールでうるおし数 min 放置したのち水を少量づつ加え次に 0.5N 水酸化ナトリウム液 3cc を加えて完全に溶解させる．この溶液にメチルレッド指示液 2～3 滴を滴下し，濃塩酸を加え液が明らかに赤色を呈したのち更に濃塩酸 2～3 滴を追加する．つぎに 1 %硫酸銅溶液 75cc 及びあらかじめ濃塩酸 2 滴を加えた無水メタノール25cc の混液を入れた 300ccビーカに電極を挿入し，スターラー上にのせ液を攪拌** しつつさきのNa-CMC溶液を少量づつ加える．コニカルビーカは少量の水で射水して よく洗い，洗液は銅塩溶液に加えて混合する．この

* Na-CMC の無水物 1g に対する N/10 硫酸液の滴定数（アルカリ度），または N/10 水酸化ナトリウム液の消費数（酸度）をccで表わす（指示薬フェノールフタレイン）．

最後の混合液の pHは2.5とする．ついで撹拌しながら3％アンモニア水を滴加しpH4.1にする．この中和点は正確***に行う撹拌を止め電極を水で洗いCu-CMCを完全に沈澱させる．上澄液はあらかじめ乾燥秤量したグラスフィルターを通して傾斜し吸引沪過する．沈澱に50％メタノール約50ccを加え撹拌し静置して上澄液を傾斜し，更に50％メタノールで沈澱をグラスフィルターに移し吸引する．ビーカに附着した沈澱はポリスマンを用いて落し完全にフィルターに移す．Cu-CMCの沈澱は50％メタノールで洗液に硫酸イオンの反応がなくなるまで洗滌を繰返す．つぎに無水メタノールで脱水し105°で2 hrs. 乾燥する．デシケーター中に放冷し秤量してCu-CMCの重量を得る．もしD.S.が既知の場合はNa-CMCの％は直ちに計算されるが，未知の場合は更に次の操作を続ける．さきに乾燥したCu-CMCは注意して疎解ビンに投入し，濃硫酸3cc及び濃硝酸20ccを加え常法の如くに湿式分解する．溶液が青色～緑色になれば加熱を止め．冷後．注意して水約50ccを加え液が約半量となるまで煮沸し，冷後濃アンモニア水で中和し100ccメスフラスコに移しビンは少量の水で洗いフラスコに加え100ccとする．この液の一定量を300cc共栓フラスコにとり氷酢酸約3ccを加えて室温に冷却したのち，溶液10ccに対して沃度加里の3gを少量の水にとかして加え，直ちに栓をして2～3分放置する．同様な操作を行つて標準銅塩溶液****に対して標定した0.01Nあるいは0.02N－$Na_2S_2O_3$溶液で滴定する．溶液の黄色が微かになつたとき，水10ccにとかしたロダンカリの2gを加え水150cc及び1％澱粉溶液の2ccを加えて滴定する．

（2） **計算法** $\dfrac{Na_2S_2O_3\text{溶液のcc数}\times\text{Cuのg数/cc}}{\text{Cu-CMCのg数}}=A$　D.S.＝162A/32－89A　D.S.がわかればNa-CMCの純度が定量される．すなわち％ Na-CMC＝$\dfrac{\text{Cu-CMCの重量}\times\dfrac{\text{Na-CMC}}{\text{Cu-CMC}}\times 100}{\text{無水Na-CMCのg数}}$

但し，32は½Cu分子量の概数，89はCH_2COO½Cuの分子量の概数，Na-CMC＝162＋80D.S.，Cu-CMC＝162＋89D.S. である

（3） **銅塩沈澱法の検討** （a） Cu-CMCの理論値と分析値　Cu-CMCが定量的に沈澱することは研究されているが著者らもD.S.の相違による銅量を測定した結果では満足すべき値を得た．これを第2表に示す．なお，Na-CMC及びCu-CMC中の結合Na％及びCu％はNa％＝2300D.S./162＋80D.S. 及びCu％＝3200D.S./162＋89D.S.で計算されこれをFig. 2に示す．

Table 2 Analysis of Cu salts of Na-CMC

Sample	wt. (g)	Analytical value			Theoretical value	
		wt. of found Cu (mg)	Cu ％	D. S.	wt. of Cu (mg)	Cu ％
1	0.0343	1.78	5.19	0.31	1.59	
*	0.0827	3.91	4.73	0.28	3.84	4.64
(D.S.＝0.27)	0.1530	7.06	4.61	0.27	7.11	
2	0.0402	3.16	7.86	0.51	2.92	
*	0.1102	7.74	7.02	0.45	7.99	7.25
(D.S.＝0.46)	0.1644	11.87	7.22	0.46	11.92	
3	0.0336	3.02	9.24	0.63	3.11	
*	0.0815	7.31	8.97	0.61	7.53	9.24
	0.1230	10.86	8.83	0.60	11.37	
(D.S.＝0.63)	0.1746	16.44	9.42	0.64	16.14	
4	0.0288	2.63	9.10	0.64	2.85	
*	0.0587	5.70	9.71	0.68	5.80	9.88
	0.0790	7.74	9.80	0.68	7.81	
(D.S.＝0.69)	0.1443	13.88	9.62	0.67	14.26	
5	0.0243	3.06	12.59	1.03	3.31	
*	0.0521	7.01	13.45	1.10	7.10	13.62
	0.0787	10.33	13.12	1.07	10.72	
(D.S.＝1.11)	0.1041	13.45	12.92	0.95	14.18	

*Their values were determined by ash-alkalinity method

** 電極を損傷しないよう操作することが望ましい．

*** 中和点が不注意に超えたときは濃塩酸でpH2.5にしてから再びpH4.1にする．

**** 高純度の金属銅約1gを精秤し，これを濃硝酸25ccで溶解させ次いで濃硫酸10ccを加え白煙の生ずるまで加熱する．冷後水50ccを加え約半量となるまで煮沸し冷後1立にうすめる．

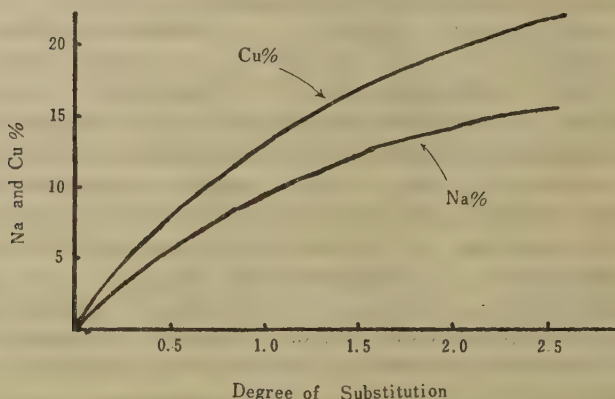



Fig. 2 Percentage of Combined Na and Cu

（b） 銅の定量法

Cu-CMC 中の銅量の定量には次の一般的な方法が使用される．すなわちヨウ素法の外，灰化法，電気的法，黄血塩法[24]，ジエチルジチオカルバミン酸ソーダ法[29~30]及びその抽出法[31~32]，銅アンモニア法[33~34]，8- ハイドロキシキノリン法[35]，等である．著者らは上述の各定量法を検討した結果，ヨウ素法及び銅アンモニア法は操作が比較的簡単であり，且つ定量すべき銅量がこれらの方法の至適濃度範囲内にある点から両法を応用することを推奨する．

D アンスロン法 アンスロン（9.10-Dihydro-9-ketoanthracen）法は Na-CMCの D.S. を直接測定する方法ではないが，もし他の方法で D.S. がわかればかなりの正確度で定量に使用される．この試薬は最初炭水化物の定性試薬[26]として登場したが，定量法にも応用[37~38]されメチルセルローズ（M.C.）[39]や Na-CMC[28] のような誘導体にまで利用されており，今では炭水化物の一般試薬となつている．糖類を熱水[40] あるいは酸性溶液で還流するとフルフラルあるいは5 - ハイドロオキシメチルフルフラルを生ずる[28)41] ことが知られているが，アンスロンはフルフラルと反応[42] して緑色の物質を形成するものと考えられている．対象物の種類によつて発色に要する加熱時間は一様でない[43] が一般に標準物質の検量線（λmax. 625mμ）から定量される．妨害する物質[28] はかなり多いので植物性食品中の Na-CMCの定性定量に利用する場合は検討を要する．

E ナフタレンジオール法

Na-CMCを三沃化燐と水で処理すると脱エーテル化されてグリコール酸を生ずる[44] ことが見出されたがヨウ素の除去が困難であるため一般に応用し難い．この *Ether-cleaving* 試薬としてある濃度の硫酸を使用する方法が試みられ[20] アンスロンで比色する際の妨害物質を含有している検液でもグリコール酸を生成する硫酸の特異性のために好んで用いられる方法[25)45] である．生成したグリコール酸は濃硫酸中でナフタレンジオール（2-7-Dihydoxy naphthalen）試薬[46~47] と反応させ，生じた紫赤色〜赤色の強さを 530mμ の波長で測定し，純グリコール酸から得た検量線から含量を求める．

（1） **操作法** （a） 検量線の作製 標準グリコール酸溶液* の0.1，0.2，0.3，0.5及び1.0cc を流出口をつけた栓つきの 20× 2 cm の試験管に精密にとり，これにナフタレンジオール試液**の20cc を加える．試験管を沸騰水浴中に 20 分間加熱し水冷したのち，溶液をあらかじめ水 10cc を入れた 50cc メスフラスコに移し，試験管は水 5 ccずつ 3 回洗滌してフラスコに加える．（発熱が甚しいからその都度冷却する．）更に水を加えて約 50ccとしよ

* 純グリコール酸を塩化カルシウムのデシケータ中で一昼夜減圧乾燥し，この 0.025g を精秤し水にとかして 250ccとする．

** 純濃硫酸 1lに純 2-7-Dihydroxynaphthaleneの 0.1g を溶かし暗処に少くとも18時間放置して，黄色が消失してから使用する．褐色ビンに貯える．

く混和して室温まで冷却したのち水を加えて 50cc とする．標準グリコール酸と同様に処理したナフタレンジオール試液の 20cc をブランクとして 530mμ における吸光度を読み，検量線を作製する．

（b）測定法　Na-CMCの粉末を 105° で 2～3 時間乾燥し，この約 25mg を精秤し 250cc 共栓三角フラスコに移す．秤量ビンは再び精秤しその差より Na-CMC の重量を求める．6％水酸化ナトリウム溶液 25cc を加え，よく揺り動かして完全に溶かしたのち水 25ccを加えてフラスコの頸及び側面を洗う．これに濃硫酸 36cc を注意して加え，還流冷却器を附して直火で 3.5 時間加熱する．室温に冷却し 100cc メスフラスコに移し，共栓フラスコは 50％硫酸の少量で 2～3 回洗い，洗液はメスフラスコに加え更に50％硫酸で100とする．また別に水25cc及び硫酸 36ccを同様に処理して対照液とする．検液及び対照液 1 cc を 20× 2 cm の試験管にとり呈色試液 20cc を加え沸騰水浴中で20分間加熱する．以下検量線作製の場合と同様に操作して吸光度を測定し，グリコール酸の濃度を求める．また次の如くに操作してもよい．Na-CMC の粉末約 25mgを精秤し100ccメスフラスコに移し 6％水酸化ナトリウム溶液25ccで溶かしたのち，水 25cc 及び濃硫酸 36cc を加え冷却したのち50％硫酸で100cc に稀め検液とする．この液 1 ccを20× 2 cm の試験管に精密に秤り呈色試液 20ccを加え，沸騰水浴中で3.5時間加熱する．冷却したのち検量線作製の場合と同様に操作して吸光度を測定し，グリコール酸の濃度を求める．

（2）**計算法**　$\dfrac{\text{測定液中のグリコール酸のg数} \times 100}{\text{秤取したNa-CMCのg数}} = A$　　D. S. ＝162A/76−80A

但し76はグリコール酸の分子量の概数

（3）**ナフタレンジオール法の検討**

（a）吸収曲線　Na-CMC を既述の如く分解して得た溶液及び純グリコール酸の吸収曲線を日立分光光電光度計（EPU-2）で測定した結果は Fig. 3に示す通りである．

（b）D. S. の相違による検量線及び理論値と分析値　D. S. の相違による検量線の相違はアンスロンで呈色させた場合と同様に当然である．従つて種々のD. S. の異なるNa-CMCを用い既述の如くその吸光度を測定した結果は殆んど満足すべき値が得られた．これらを第3表及び Fig. 4に示す．なお Na-CMC から生ずるグリコール酸の％は次式で計算する．グリコール酸％＝76D. S. ×100/162＋80D. S.

Table 3.　Amoumts of Glycolic acid produced from Na-CMC of various D. S.

Sample	Wt. (mg)	Analytical value			Theoretica lvalue	
		Extinction	Wt. of gly colicacid (μg)	Glycolicacid (%)	Wt. of glycolic-acid (μg)	Glycolic acid (%)
1 (D. S. ＝0.27)	0.10	0.074	11.4	11.40	11.18	11.18
	0.20	0.136	21.7	10.85	22.35	
	0.30	0.208	34.2	11.40	33.53	
	0.60	0.387	64.3	10.72	67.06	
2 (D. S. ＝0.4)	0.05	0.057	8.8	17.60	8.79	17.59
	0.10	0.102	16.3	16.30	17.59	
	0.20	0.219	36.0	18.00	35.17	
	0.30	0.318	52.5	17.50	52.76	
	0.50	0.504	83.6	16.72	87.93	
3 (D. S. ＝0.63)	0.05	0.069	11.0	22.00	11.27	22.54
	0.10	0.135	22.0	22.00	22.27	
	0.30	0.406	67.0	22.33	67.63	
	0.40	0.541	90.0	22.50	90.04	
	0.60	0.743	—	—	—	
4 (D. S. ＝1.11)	0.05	0.099	15.7	31.40	16.72	33.44
	0.10	0.214	35.2	35.20	33.44	
	0.20	0.408	67.8	33.90	66.88	
	0.30	0.603	100.1	33.37	100.32	
	0.40	0.810	—	—	—	

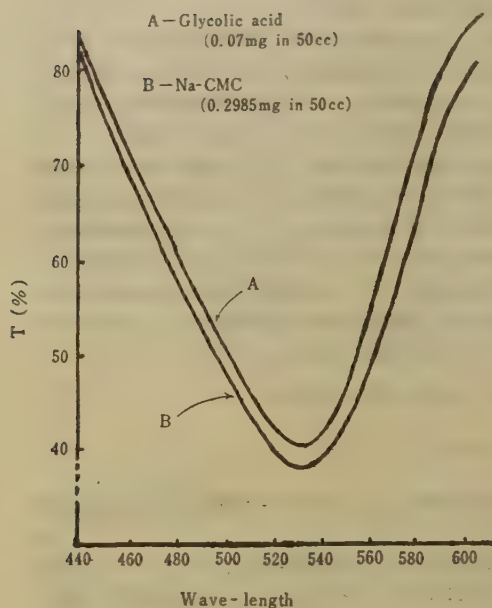
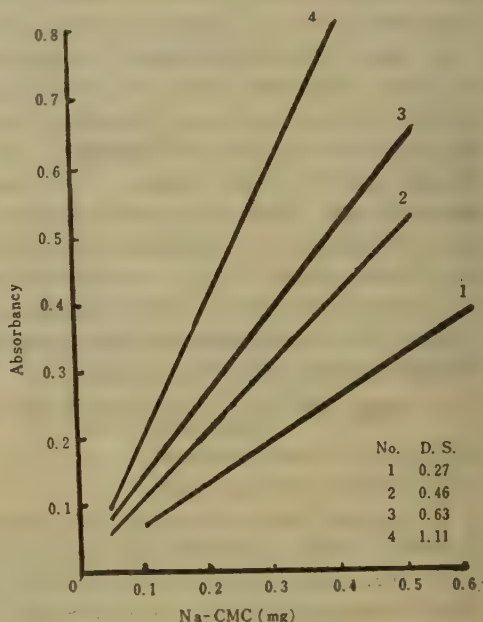



Fig. 3　Absorption curve　　　Fig. 4　Calibration Curve

II　実験材料

A　製品検査製品　我が国で実施されているNa-CMCの製法は殆んど同じ[49]である　また用途別による製造条件も殆んど差異はない．従つて当所において製品検査として取扱うNa-CMCはそのまま需要の実態に通ずるものと考えて大過ない．著者らはこの観点から各社の製品検査製品を使用し．比較のために次のB及びC製品を実験に供した．

B　低エーテル化製品　エーテル化反応開始後15分，30分，40分及び50分（それぞれLow 1，2，3及び4とする）経過後の粗製Na-CMCを80%メタノールで精製したものである．

C　高エーテル化製品　製品検査合格品を第4表の如き条件でエーテル化を行い，80%メタノールで精製した．（条件に従つてそれぞれをHigh 1，2，3及び4とする）．更にHigh 3及び4について再エーテル化を行い同様に精製した．（これをHigh3′及び4′とする）

Table 4.　Condition of Etherifications

	nt. of Cellulose (g)	40% CH_2ClCO_2-Na sol. (cc数)	40% NaOH sol. (cc数)	Time (h)	Temp. C
1	10	15	10	24	37°
2	10	25	10	24	37°
3	10	35	10	24	37°
4	10	50	10	24	37°

III　実験成績

此等の実験材料について灰分アルカリ度（Ash-Alkarinity），硫酸メタノール（H_2OS_4・MeOH），銅塩沈澱（Cu-ppt）及びナフタレンジオールの諸法を行つた結果を第5～6表に示す．

Table 5. Degree of Substitution of Na-CMC by Various Methods

Company	Date (Manufactured)	Methods					%Na-CMC [c]
		Ash-Alkalinity	H_2SO_4-MeOH-F [a]	H_2SO_4-MeOH-R [b]	Naphthalendiol	Cu-Ppt	
G	31. 4. 23	0.66	0.63	0.63	0.64	0.63	98.80
	31. 6. 6	0.62	0.62	—	0.61	0.60	99.30
	31. 8. 17	0.63	0.61	—	0.62	0.60	101.04
Ne	31. 4. 9	0.61	0.60	0.60	0.61	0.60	100.71
	31. 6. 7	0.68	0.68	—	0.69	0.64	98.88
	31. 8. 20	0.69	0.66	—	0.66	0.64	99.03
	31. 10. 25	0.52	0.52	—	0.52	0.50	99.02
	32. 3. 9	0.60	0.60	—	0.63	—	—
Ni	31. 4. 19	0.66	0.63	0.63	0.64	0.63	97.53
	31. 6. 18	0.69	0.69	—	0.68	0.67	99.46
	31. 8. 30	0.64	0.64	—	0.63	0.63	100.37
	31. 11. 16	0.54	0.53	—	0.53	0.50	101.14
	32. 3. 15	0.55	0.54	—	0.56	—	—
K	31. 3. 30	0.64	0.63	0.61	0.62	0.60	101.43
	31. 6. 19	0.65	0.63	—	0.62	0.60	99.05
	31. 9. 28	0.65	0.62	—	0.64	0.63	100.40
A	31. 3. 30	0.58	0.56	0.55	0.59	0.57	99.02
	31. 7. 19	0.59	0.57	—	0.58	0.57	98.37
	31. 9. 6	0.57	0.54	—	0.55	0.54	97.71
	32. 3. 5	0.51	0.48	—	0.50	—	—
T	31. 4. 10	0.60	0.58	0.58	0.59	0.58	98.46
	31. 6. 12	0.66	0.66	—	0.66	0.63	98.93
	31. 8. 22	0.54	0.53	—	0.55	0.51	98.71
	31. 11. 7	0.69	0.69	—	0.70	0.67	98.80
	32. 3. 12	0.58	0.54	—	0.57	—	—
Kw	31. 11. 8	0.72	0.70	—	0.71	0.70	99.17
	31. 12. 5	0.73	0.70	—	0.72	0.71	99.04
Kt	31. 11. 24	0.67	0.68	—	0.68	0.64	100.78
	32. 2. 28	0.51	0.50	—	0.50	—	—
Ko	31. 11. 20	0.46	0.45	—	0.48	0.54	98.03
H	32. 3. 8	0.57	0.56	—	0.57	—	—
S	32. 3. 11	0.52	0.50	—	0.50	—	—

a Filtrate[21]　b Residue[20)21)]　c Na-CMC% was calculalated from copper precipitation method

Table 6. Degree of Substitution of Na-CMC by Various Methods

Classification	Sample No.	Methods					%Na-CMC [c]
		Ash-alkarinity	H_2SO_4-MeOH-F [a]	H_2SO_4-MeOH-R [b]	Naphthalendiol	Cu-Ppt	
Low	1	0.26	0.25	—	0.27	—	—
	2	0.27	0.25	—	0.24	—	—
	3	0.25	0.25	—	0.25	—	—
	4	0.28	0.27	—	0.28	—	—
High	1	1.05	1.02	0.98	1.10	0.97	98.97
	2	1.11	1.06	1.01	1.09	1.02	99.26
	3	1.14	1.14	1.09	1.21	1.12	101.14
	4	1.26	1.20	1.16	1.26	1.24	100.87
	3′	1.23	1.21	—	1.34	1.19	100.35
	4′	1.30	1.25	—	1.39	1.27	99.63

a Filtratl[21]　b Residue[20)21)]　c Na-CMC % was calculated from copper precipitation method

考察とむすび

Na-CMC のエーテル化度（D.S.）の測定はその品質を決定する要件である．しかも製造条件の差異によつて各種のD.S.製品が得られ，著者らの目的である食品中の Na-CMC の定量にはこの測定が先決となる．D.S.の測定法としては多数あげられているが著者らは灰分アルカリ度，硫酸メタノール，銅塩沈澱及び比色法について実験し，またこれらの諸法を検討した．最もかんたんな方法として灰分アルカリ度及び硫酸メタノール法があげられるが，後者の滴定値は前者より少ないのが普通である．銅塩沈澱法及び比色法は操作が煩雑である．特に銅塩法は操作中の不注意が大きな誤差の原因となるので熟練を要する．然し一般に金属塩沈澱法の利点は混合物中のNa-CMC の定量がやや容易に出来ることであり，特に銅塩はよく理論値と一致するので今後広く応用されるものと思われる．ナフタレンジオール法は非常に正確であり（高エーテル化物には多少高い値を与える）妨害する物質もアンスロンの如く多くない．従つて適当に操作すればNa-CMCの特異試薬ともなり得る．以上の諸法を応用して市販品である各種の Na-CMC の D.S. を測定した結果は 0.5～0.7 の製品が大部分であつた．また D.S. 0.63の製品に再びエーテル化反応を行うと D.S. 1.05～1.26 の製品が得られ，これを再びエーテル化してもD.S.はわずかに増大するに過ぎなかつた．

文　献

1) 厚生省令第6号；昭27.
2) 桜田：工化，31，67（1928）.
3) 早川他：東工試報，49回，331-406（1954）
4) Waldeck, Wm. F.(to Wyandotte Chemical Corp). U.S.P. 2, 510, 355 June 6, (1950); C.A., 44, 7538 (1950),
5) Righy, C.H. (to Imp. Chem. Ind. Ltd.) U.S.P. 2, 607, 772 Aug. 19 (1952); C.A., 46, 10621(1952)
6) Hodge, A. *et al.*,(to Brit. Celanese Ltd.) Brit. P. 686, 001. Jan. 14 (1953). C.A., 47, 5118 (1953); U.S.P. 2, 639, 281. May 19 (1953).
7) 勝浦，斎藤，香川：繊維学誌，6，268（1950）.
8) Dieckman, S.F. *et al.*, *Ind. Eng. Chem.*, 45, 2287–90 (1953).
9) Dyer, E., Arnold, H.E. : *J. Am. Chem. Soc.*, 74. 2677–9 (1952).
10) Jenkins, R.H. Clr. : *Chem. Eng. News.*, 32, 3310–12 (1954).
11) Rigby, D.H. : U.S.P. 2, 667, 482 Jan. 26 (1954).
12) Sobue, H., Tabata, Y : *J. Chem. Soc. Japan. Ind. Chem.* Sect. 56, 638–40 (1953).
13) 香川他の高分子に関する一連の研究，例えば工化，54，394（1951）
14) 生源寺，高橋：東工試報48回，No.2（1953）.
15) Grimshaw, E.P. : Plastics Inst. (London) Trans. 20, No. 42, 9–42 (1952).
16) Hercules Pamphlet“ Hercules CMC, Water Soluble Cellulose Gum” Printed U.S.A. 年代不明.
17) Hollabaugh, C.B. *et al.*, *Ind. Eng. Chem.*, 37, 943 (1945).
18) 青木：薬学研究，23，No.3，110–114（1951）.
19) 坂上，白石：国立公衆衛生院研究報告，4，No.4，7–9（1955）.
20) Eyler, R.W. *et al.*, *Anal. Chem.*, 19, No. 1, 24 (1947).
21) 東工試，Pamphlet（mimeograph，“CMC塩の基準分析法（案）”（1952）.
22) Conner, A. Z. *et al.*, *Anal. Chem.*, 22, 1129 (1950).
23) Bouttemy, M. : *Bull Soc. Chim. France* 343–4 (1952) ; C.A., 46, 11672 (1952).
24) Francis, C.V. : *Anal. Chem.*, 25, 941–3 (1953).
25) N.N.R., 275–277 (1953).
26) Kimoto, K : *Repts. Inst. Sci., Tokyo Univ.*, 3, 20–55 (1952).
27) Sideri, C.N. *et al.*, J.A.P.A. *Sci. Ed.*, 44, 759 (1955).

28) Black, H. C., Jr., *Anal. Chem.*, 23, 1792 (1951).
29) Snell, F. D., Snell, C. T. : " Colorimetric Methods of Analysis" Vol II, P107(D. Van Nostrand Comp.) (1954).
30) Frear, D. E. H. : *Ind. Eng. Chem., Anal, Ed.*, 11, 494−5 (1939).
31) Parks, R. Q. *et al., Ihid.*, 15, 527−33 (1943).
32) 須藤：日化., 73, 753 (昭27).
33) Mehling, J. P. : *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 13, 533−5 (1941).
34) Milner, 0. 1 : *Ibid.*, 18, 94−96 (1946).
35) Haeller, T. : *Ibid.*, 15, 270−2, 346−9 (1943).
36) Dreywood, R. : *Ibid.*, 18, 499 (1946).
37) Morse, E. F. : *Anal. Chem.*, 19, 1012 (1947).
38) Viles ,F. J., Jr., *et al., Ibid.*, 23, 1795 (1951).
40) 小松，田中：工化., 51, 15−21 22−31 (昭5).
41) Wolfram, M. L. *et al.,J. Am. Chem. Soc.*, 70, 514 (1948).
42) Sattler, L. *et al., Science*, 108, 207 (1948).
43) 三雲他：都衛研年報，V, 148−153 (昭28).
44) Chowdhury, J. K. : *Biachem. Z.*, 148, 76−88 (1924).
45) Szalkowski, C. R, Mader, W. J, : *J. A. P. A.,Sci. Ed.*, 44, No. 9, 533 (1955),
46) Feigl, F. : "Spot Tests" Vol. II, P 249−50 (Elsevier Publishing Comp.) (1954).
47) Calkins, V. P. : *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 15, 762 (1943).

Summary

Acid-methanol, ash-alkalinity, copper salt precipitation, anthrone, and naphthalenediol methods are described for the determination of the degree of substitution of sodium carboxy-methylcellulose. These methods were discussed.

Received June 18, 1957

遮光容器に関する研究（第2報*）

井　上　勲，野　崎　泰　彦

Tests for Amber Glass Containers : Light Transmission and Resistance to Various Solutions. II.

Isao Inoue and Yasuhiko Nozaki

まえがき　前報に引き続いて今回はやや大型の褐色アンプルについてその光吸収と化学的抵抗性とを，又褐色バイアル瓶の光吸収を検討した．光の透過率は 330～800mμ（アンプルの場合），350～800mμ（バイアルの場合）にわたつて測定し，おのおのの透光率のばらつきと壁の厚さのばらつきとの関係について考察した．またガラスの着色に用いられている鉄が溶出する程度をしらべるため，アンプルを pH 4 及び 9 の緩衝液で抽出した．なお或種の薬品は鉄と錯化合物を作ることを考慮してE．D．T．A．による抽出を行つた．

実験方法と結果

材　料　試料はいずれも日本アンプル工業会から提供されたもので Table 1 のような組成である．

Table 1.　Composition of Container Glasses

Component %	Ampule	Vial
SiO_2	64.00	62.88
Al_2O_3	4.55	5.59
B_2O_3	11.50	13.05
Na_2O	6.25	9.17
K_2O	0.78	
Fe_2O_3	4.40	2.13
MnO_2	8.43	0.57
RO**	—	6.21

**R : Ca, Mg

Table 1 からも明らかなように本実験に用いたアンプルは前報の中間茶（Medium brown）の着色度のものに相当する．

I　透過率の測定

20ccの褐色アンプルを Fig. 1のように切り，又バイアルの場合はくだいて試料片を作つて手製のわくに固定し日立分光光度計 EPU－2 型で空気を対照として各波長における透過率***（Tyansmission, T'（%））を測定した．アンプル，バイアル各10個から試料片 1 個ずつを作つた場合の透過率，その平均値及び標準偏差の値は Table 2, 3；Fig. 2～5のようになる．

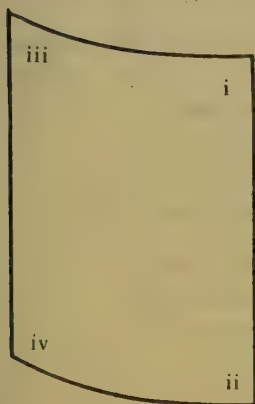



Fig. 1 Sample for Transmission Measurement, showing four Sites for Measurement of Thickness

* 野崎泰彦，河村正一：本誌 74，421（1956）を第 1 報とする．

*** 空気とガラスとの境界面において光は 2 回反射されるので本報の実験条件ではこの反射による光の損失をも含めた透過率を測定することになる．従つてこの透過率は Transmission であつて反射の効果を除いて得られる Transmittance ではない．なお試料片の曲率が大して問題とならないことは前報でのべた．

Table 2. Light Transmission of Amber Glass Ampules (1)

Wave Length mμ \ No. of Sample	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	M*	σ**	$\frac{\sigma}{M}\times 100$
330	0	0	0.2	0	0	0.2	0.5	0	0	0.3	0.1	0.1	100
350	0	0	0.5	0.3	0	0.6	0.5	0.5	0.4	1.0	0.4	0.3	75.0
370	2.7	1.6	5.9	4.4	0.5	3.7	3.3	2.4	2.5	4.8	3.2	1.5	46.9
390	8.0	7.3	16.0	13.6	4.4	12.0	10.9	9.9	9.9	13.2	10.5	3.2	30.5
400	14.0	13.3	24.8	22.3	9.3	19.4	17.9	16.9	16.8	21.5	17.6	4.4	25.0
410	20.0	19.2	30.9	28.8	14.0	26.0	24.2	23.0	23.0	28.0	23.7	4.8	20.3
420	20.5	20.0	31.6	29.2	14.4	26.7	24.7	23.6	23.7	28.3	24.3	4.8	19.8
430	25.5	24.6	36.7	34.2	19.0	31.2	29.3	28.4	28.6	33.4	29.1	4.9	16.8
450	34.3	33.8	46.0	44.2	28.0	41.0	39.0	37.7	38.0	42.7	38.5	5.1	13.2
470	46.0	45.5	56.3	55.2	40.0	52.0	50.3	49.3	48.4	53.4	49.6	4.7	9.5
500	58.3	57.7	67.2	66.0	53.1	63.6	62.1	61.2	61.3	65.4	61.6	4.1	6.7
550	72.5	72.0	77.9	77.0	68.2	75.7	74.6	74.2	74.0	77.4	74.2	2.6	3.5
600	79.0	78.7	83.3	82.3	76.3	81.5	81.0	79.9	80.2	82.4	80.5	2.0	2.5
650	82.5	82.2	85.5	85.0	80.0	84.5	84.0	83.4	83.3	86.2	83.7	1.7	2.0
700	84.5	84.2	87.2	86.4	82.3	86.1	85.9	85.4	85.2	87.6	85.5	1.5	1.8
750	84.5	84.6	87.5	86.9	82.7	86.5	86.4	85.6	85.5	88.3	85.9	1.6	1.9
800	85.3	84.6	87.5	86.6	82.3	86.5	86.4	85.8	85.5	88.4	85.9	1.6	1.9

* Mean Value ** Standard Deviation

Table 3. Light Transmission of Amber Glass Vials

Wave Length (mμ)	350	370	390	400	406	410	416	420	430	450	470	480
Mean Value, M*	0	0.2	1.6	4.0	5.9	6.9	7.1	7.2	9.6	14.7	24.2	28.4
Standard Deviation, σ	—	0.3	2.2	3.8	4.9	5.4	5.4	5.4	6.3	7.5	8.7	8.9
$\frac{\sigma}{M}\times 100$	—	150.0	137.5	105.3	83.1	78.3	76.1	75.0	65.6	51.0	36.0	31.3

λ (mμ)	490	500	550	600	650	700	750	800
M*	32.4	36.2	54.1	66.0	73.2	78.9	81.3	82.2
σ	8.9	8.7	6.9	5.8	4.5	3.5	3.0	2.7
$\frac{\sigma}{M}\times 100$	27.5	24.0	12.8	8.8	6.1	4.4	3.7	3.3

* Mean Value of Ten Data. (Each datum is omitted.)

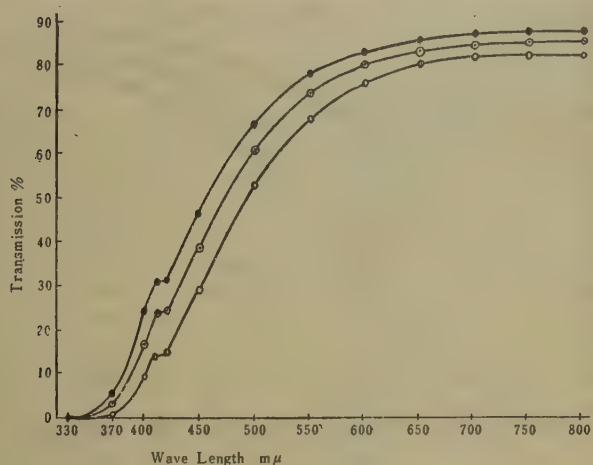



Fig. 2 Transmission Spectra of Amber Glass Ampules

● Maximum
○ Minimum
⊙ Mean

Measurements were made with ten Samples.

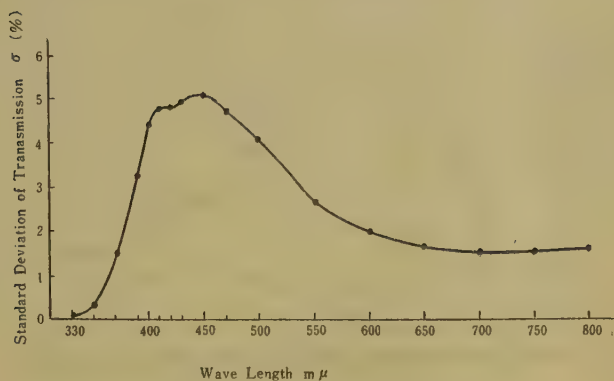



Fig. 3 Standard Deviation of Light Transmission of Amber Glass Ampules

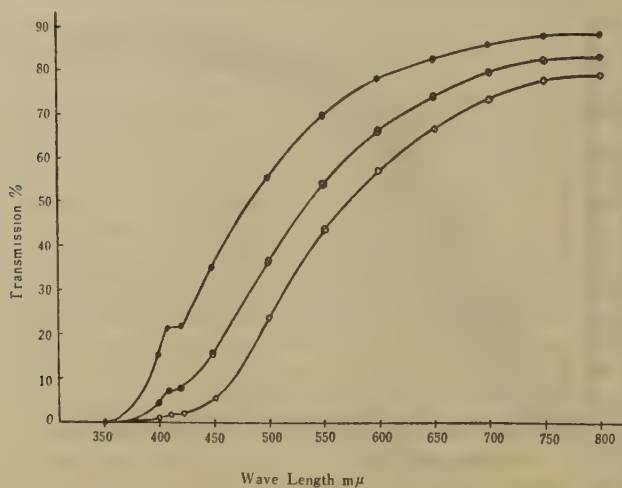



Fig. 4 Transmission Spectra of Amber Glass Vials

● Maximum
○ Minimum
◉ Mean
Measurements were made with ten samples.

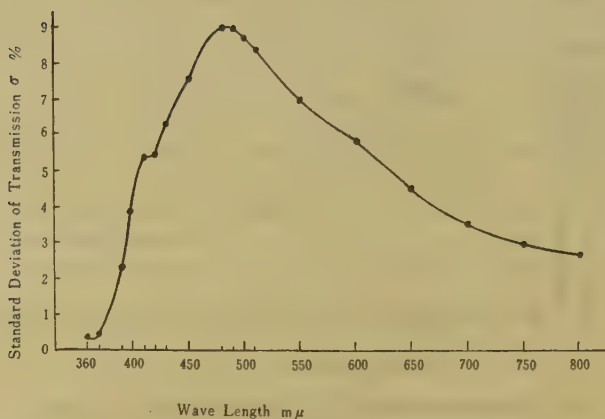



Fig. 5 Standard Deviation of Light Transmission of Amber Glass Vials.

次に1個のアンプルでも部分により壁の厚さが異なることが当然考えられる．そこで1個のアンプルの相対する2つの部分から試料片を作り，それぞれの透過率を測定した．その結果を Table 4, Fig. 6 に示す

Table 4. Light Transmission of Amber Glass Ampules (2)—A and B are prepared from different parts of a single ampule

No. of Sample / Wave Length mμ	11		12		13	
	A	B	A	B	A	B
330	0	0.5	0	0	0	0
350	0.2	0.5	0	0.3	0.1	0.4
370	2.4	1.7	1.4	3.0	1.0	4.5
390	10.0	8.0	6.2	10.6	4.9	13.8
400	16.9	14.5	11.3	17.5	9.5	21.8
410	23.3	20.3	16.8	24.0	14.5	28.2
420	23.6	20.6	17.5	25.0	15.2	29.0
430	28.5	25.4	22.3	29.5	19.5	34.2
450	38.0	34.5	31.3	39.0	28.6	43.4
470	49.4	46.3	43.0	50.2	40.4	54.3
500	61.4	58.5	56.0	62.0	53.5	65.3
550	74.2	72.5	70.5	74.0	69.0	76.6
600	80.2	79.3	78.0	80.0	76.4	82.0
650	83.3	83.3	81.5	83.2	80.3	85.0
700	85.2	85.3	83.6	85.1	82.6	86.3
750	85.7	85.6	84.3	85.4	83.3	87.1
800	85.6	85.5	84.2	85.3	83.0	87.1

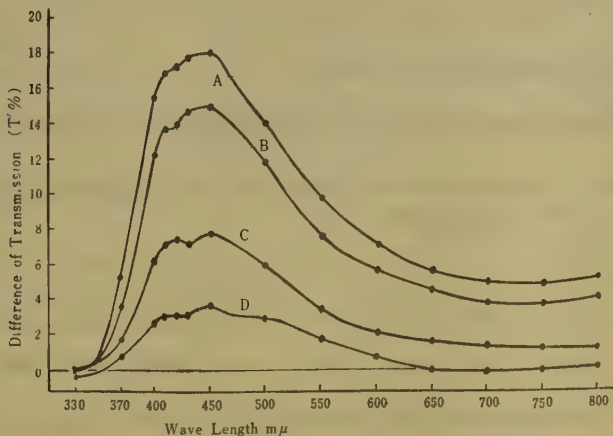



Fig. 6 Fluctuation of Light Transmission of Amber Glass Ampules, with Respect to Wave Length

A : Difference between max. and min. transmission obtained with ten samples (cf. Table 2)

B : Difference between No. 13A and No. 13B
C : Difference between No. 12A and No. 12B
D : Difference between No. 11A and No. 11B

} A and B represent two pieces taken from a single ampule (cf. Table 4)

Ⅱ　透過率と壁の厚さとの関係

(1)　壁の厚さ

アンプルやバイアルの厚さはかなり不均一であることが考えられる．そこでアンプルではFig. 1に示すように，またバイアルでは適宜にえらんだ四偶の $i \sim iv$ のそれぞれの位置から，$d_1=\frac{i+iv}{2}$，$d_2=\frac{ii+iii}{2}$，$d_3=\frac{i+iii}{2}$，$d_4=\frac{ii+iv}{2}$ を求めて $d_1 \sim d_4$ の最大と最小との巾を比較するとその値の殆んどすべては0. 03mm以下（アンプル），0. 20mm以下（バイアル）であり，これらと i, ii, iii, iv の平均値 d_0 との差 $d_0-(d_1 \sim d_4)$ の最大値も 0. 02 mm（アンプル），0. 20mm（バイアル）を超えない．従つて厚さの測定法はどれをえらんでもよいと思われるが，本実験では d_0 を厚さとした．

(2)　透過率との関係

Fig. 3，Fig. 5 から明らかなようにアンプル及びバイアルのT′（％）のばらつきの最も大きい波長はそれぞれ約 450mμ 及び約 480mμ（～490mμ）であるが，各々の壁の厚さとこれらの波長におけるT′（％）との関係は Table 5,6 のようになる．

Table 5.　Relationship between Thickness and Light Transmission of Amber Glass Ampules at 450mμ

No. of Sample	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11A	11B	12A	12B	13A	13B
Thickness* d_0 (mm)	0.72	0.67	0.54	0.70	0.70	0.66	0.63	0.59	0.65	0.58	0.69	0.68	0.66	0.61	0.71	0.63
T′ (%) at 450mμ	34.3	33.8	46.0	44.2	28.0	41.0	39.0	37.7	38.0	42.7	38.0	34.5	31.3	39.0	28.6	43.4

* Mean value (M) and standad deviation (σ) of thickness are found to be 0.65 and 0.05, respectively.

Table 6.　Relationship between Thickness and Light Transmission of Amber Glass Vials at 480mμ

No. of Sample	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Thickness* d_0 (mm)	2.53	2.40	3.41	2.14	3.01	1.72	2.33	2.91	2.45	2.35
T′ (%) at 480mμ	30.3	24.0	21.4	33.6	15.5	49.0	25.0	20.5	31.6	33.1

* Mean value (M) and standard deviation (σ) of thickness are found to be 2.53 and 0.43, respectively.

従つて $\frac{\sigma}{M}$ の値はアンプルでは0. 077，バイアルでは0. 170となる．

今，空気－ガラスの２つの界面における反射を８％として求めた Transmittance（T）すなわち $\frac{T'}{0.92}=T$ と d_0 の実測値とから Lambert の法則 $-logT=Kd_0$ における吸収係数 K を計算してみると Table 7,8 のようになる．

Table 7.　Absorptivity Coefficient of Amber Glass Ampules

No. of Sample	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11A	11B
T* at 450mμ	0.373	0.367	0.500	0.480	0.304	0.446	0.424	0.410	0.413	0.464	0.413	0.375
K**	5.95	6.50	5.57	4.55	7.39	5.31	5.91	6.56	5.91	5.75	5.57	6.26

No. of Sample	12A	12B	13A	13B
T* at 450 mμ	0.340	0.424	0.311	0.472
K**	7.10	6.11	7.14	5.18

* Transmittance, corrected for the reflection at two air-glass surfaces. Energy-losses by reflection are taken as 8%.

** Mean value (M) and standard deviation (σ) of K are found to be 6.05 and o.74, respectively.

Table 8.　Absorptivity Coefficient of Amber Glass Vials

No. of Sample	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
T* at 480mμ	0.329	0.261	0.233	0.365	0.168	0.533	0.272	0.223	0.343	0.360
K**	1.91	2.43	1.86	2.05	2.57	1.59	2.43	2.24	1.90	1.89

* Transmittance, corrected for the reflection at two air-glass surfaces. Energy-losses by reflection are taken as 8%.

** Mean value (M) and standard deviatiation (σ) of K are found to be 2.09 and 0.30, respectively.

Ⅲ　鉄の定量

いずれの場合も次にのべる抽出液を22ccずつ入れ加圧滅菌器で2気圧，45分加熱して抽出を行つた．

(A) 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液（pH 4，14°，イオン強度 0.40）

氷結して精製した酢酸から作つた $M/5$ 酢酸と，炭酸を含まない $N/5$ 水酸化ナトリウム液とを混ぜBeckman G型 pH メーターで pH を 4.0 に調整した．（抽出後のpH 約4.8）

(B) 炭酸ナトリウム緩衝液（pH 9，14°，イオン強度 0.25）

Mallinckrodt Reagent Grade, Sodium Carbonate から作つた $M/10$ 炭酸ナトリウム液と $N/10$ 塩酸とを混ぜ pH を 9.0 に調整した．（抽出後の pH 約 8.7）

(C) $M/100$ E. D. T. A. 2Na液（pH 4.6，14°，イオン強度0.03）

(A) (B) と同じように加熱及び常温で24時間振りまぜて抽出した．なお E. D. T. A. 2Na は第一化学薬品のを用いた．（pH：加熱後約4.9，振盪後約5.4）

(D) 鉄の定量[1]

いずれの場合も抽出液は 20cc をとり10%ヒドロキシルアミン溶液で還元し，0.5%オルトフェナントロリン溶液で呈色させ，波長510mμ，スリット巾 0.05mm とし，pH 4 及び E. D. T. A. の場合は全量 3ccとし，pH 9 の場合は全量10ccとして吸光度を測定した．pH 4 の場合は抽出液を白金皿中に蒸発乾固後同じ緩衝液 1cc にとかして試料とした．pH 9 の場合は上と同様乾固し，濃硝酸数滴でうるおし直火で硝酸を駆逐後水にとかして試料とした．E. D. T. A. の場合は白金皿中蒸発，灰化し0.2N硫酸 1 ccにとかして試料とした．

検量線は硫酸第一鉄アンモニウム標準液を用いて作つた．すなわち特級硫酸第一鉄アンモニウム 7.0249g を硫酸（1：5）100cc にとかし水を加え全量を 1l とし過マンガン酸カリウム液で標定し二価鉄を 1,000γ/cc に含むように調製した．検量線の誤差は (A)，(C) の場合1γ/cc 以下では±10%以下であり，これ以上5γ/cc までは±3%以下である．なお (B) の場合は±10%以下（1γ/cc以下），及び±2%以下（4γ/ccまで）である．

定量結果は Table 9, 10 の通りである．表中の数字は抽出液 1 cc当りの鉄の含量をγで表わしたものである．

Table 9. Determination of Iron Extracted with Acetate Buffer (pH 4) and Sodium Carbonate Buffer (pH 9) by Heating for 45 min. at 2 atm.

Buffer \ Iron	Iron found* γ/cc					Mean Value
Acetate (pH 4)	0.05	0.06	0.07	0.04	0.06	0.06
Sodium Carbonate (pH 9)	0.47	0.35	0.18	0.35	0.37	0.34

* The amount of iron extracted is expressed in γ per cc portion taken out of 20cc of solution.

Table 10. Determination of Iron Extracted with 0.01M E.D.T.A. Solution

Treatment \ Iron	Iron found* γ/cc							Mean Value
Heating**	0.16	0.025	0.23	0.06	0.17	0.11	0.09	0.12
Shaking only***	0.12	0.05	0.21	0.10	0.13	0.11	0.07	0.11

* The amount of iron extracted is expressed in γ per cc portion taken out of 20cc of solution.

** Ampules were heated for 45 min. at 2 atm.

*** Ampules were shaken for 24 hrs. at room temperature.

考　　察

遮光度については，Fig. 3 及び Fig. 5 から明らかなように透過率のフレが最も大きい波長はアンプルで約 450 mμ，バイアルで約 480mμ であるが，このことは曲線の勾配がこの辺りで極大となることから当然である．アンプルでは透過率の標準偏差は 450mμ で約 5 %，それ以外の波長ではすべて 5 %以下である．しかし同一アンプルの異なる部分の透過率の差は最大値約 15% に達したが，それでもなお異なるアンプルにおける最大値（約18%）よりは小であつた．結局各個の試料間の測定値のばらつきは試料毎の壁の厚さのばらつきによるものと思われ，同様のことはバイアルの場合にも考えられる．Lambert の法則に従うものとして計算した吸収係数Kの値がTable7, 8 に示すように，厚さの不均一と測定誤差の大きいこと，及び反射に関する補正に大ざつぱな近似を行なつたことを考えに入れれば，かなりよく互に一致していることから明らかである．J.P. VI 追補6（1956. 12. 5 公布）では空気を対照とした 290～450mμ 及び 590～610mμ の透過率はそれぞれ50%以下及び60%以上と規定している．著者等が測定したアンプルの透過率はこの規定の中に入るが，バイアルでは 10個の中 3 個までが 590～610 mμ において60%以下の透光度を示した．これは Table 5, 6 に示したようにバイアルでは厚さのばらつきがアンプルのそれより大きいためと考えられる．

鉄の溶出度は従来は単に稀薄な酸又はアルカリを用いて抽出する方法が行われてきたがこれでは抽出の間に液のpHが著しく変化するし，また多くの注射液は緩衝作用をもつているので緩衝液で抽出する方が実際的であると思われる．アルカリ性で抽出した場合は酸性より鉄の溶出がかなり多かつたがそれでも緩衝液 1 cc 当り十分の数 γ を超えないことを知つた．アルカリ性で鉄の溶出の多いのはガラスの網目構造をなすケイ酸の骨核がこわれるためであろう．さらに多くの薬品が金属と錯化合物を作ることを考慮して 0.01M E.D.T.A. 2ナトリウム液で抽出したが，溶出鉄量はさほど多くはなかつた．これは充塡した溶液のpHが低かつたため，一つには錯生成に不利であることと，さらに上にのべたように酸性では鉄の溶出が少いことのためと思われる．

この実験に多大の関心を寄せられた所長刈米達夫博士，分光光度計の使用に便宜を与えられた食品添加物部の諸氏，加圧滅菌器の使用に援助を与えられた衛生細菌部の諸氏に深謝する．なお本研究の費用の一部は厚生科学研究費によつた．

文　献

1) W. B. Fortune, M. G. Mellon : *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.* 10, 60 (1938).

Summary

The light transmission of 20 cc amber glass ampules and 25cc amber glass vials were measured in corelation with their thicknesses. It was shown that the wave length which gives the largest differences of transmission was at about 450mμ for ampules and 480～490mμ for vials. Standard deviations of transmission of ampules at 450mμ and of vials at 480 mμ are about 5 % and 9 % respectively and less at other wave lengths. The absorptivity of the ampule- and vial-glasses was calculated from the transmtitance corrected for the reflection and the mean thickness.

For the extraction of iron, buffer solutions of pH 4 and 9 which are consistent with the buffer action of many solutions for injection were used. E. D. T. A. solution was also used for this purpose because several drugs exert complexing ability.

Received June 18, 1957

化粧品の規格検査法について（第7報）ファウンデーションクリーム中の無機性常成分の定量について（その1）チタンの定量

市川重春，南城　実，林　悦子

Research on the Standard Determination Method of Cosmetics. Ⅶ. On the Estimation of Inorganic Components in Foundation Cream (1) Assay of Titan.

Shigeharu ICHIKAWA, Minoru NANJŌ and Etsuko HAYASHI

まえがき　ファウンデーションクリームは近来白粉の代りにその需要が著しく増加して来た．その成分は，蜜蠟，流動パラフィン，ラノリン，高級アルコール，水，乳化剤，酸化チタン，亜鉛華，タルク，着色料及び香料などで，いわば白粉とクリームの中間のものと考えられ，その無機成分の含量の多少によつて白粉類かクリーム類に分離され物品税も異なるため，簡単で確実な定量試験法が要望されている．

著者等はファウンデーションクリームの無機性常成分中必須成分である酸化チタンの定量法の簡易化を企図し，硫酸酸性で過酸化水素を用いてチタンを比色定量する法によれば簡単な操作で比較的短時間に共存する他のイオンの妨害を受けることなくチタンを定量することができたのでここに報告する．

定量法　試料約2gを正確に秤り，250ccの共栓フラスコに採り，水浴上（約70°C）で乾燥したのち，ウルフィング液100ccを加えはげしくふりまぜて暫時放置後可溶分を分離する．不溶分に硫酸25cc及び硫酸アンモニウム10gを加え初めは徐々に加熱し，終りに強熱して抽出し，冷後液温が50°C以上にならないように注意しながら水約100ccを加えてうすめた後沪過する．沪紙上の残渣は温水で洗浄し，洗液は沪液に合す（沪洗液1）．

残渣は沪紙と共に灰化したのち，焦性硫酸カリウム2gを加え熔融し，冷後融成物を温稀硫酸約50ccで抽出し，放冷後沪過し沪液は前の沪洗液1に合し，さらに水を加えて全量を250ccとし検液とする．

検液100ccをビーカにとり，メチルレッド指示薬数滴を加えアンモニア試液で中和し，暫時水浴上に放置後生成した水酸化物の沈澱を遠心分離する．沈澱物は温稀硫酸に溶解し，溶液を100ccのメスフラスコに移し，水を加えて正確に100ccとし，その50ccを採り，過酸化水素試薬で発色させ，日立分光光電光度計EPV-2型（液槽10mm使用）で400mμの波長でその吸光度を測定し，チタンを定量する．

むすび　上記定量法により市販のファウンデーションクリームについてチタンを定量した結果を第1表に表示した．なお同時にこの試料に既知量のチタンを添加し，いわゆる添加試験を行つた結果をも第1表に併記したが，チタンの定量値と計算値との間には満足すべき一致が見られ，この方法によつて試料中のチタンの含有量が正しく求められることを認めた．

Table 1.

Ti. in Sample (mg)	Ti. A. d. d. (mg)	Theory (mg)	Found (mg)	Error (%)
19.98	—	10.98	11.02	+0.4
〃	0.79	11.77	11.79	+0.2
〃	3.95	14.93	15.00	+0.5
〃	7.90	18.88	18.94	+0.3

Summary

Authors attempted to improve the determinations of titan in foundation cream and obtained the best result by the colorimetric method. This method is due to that the acidic tatanicacid solution with hydrogen peroxide a severe yellow colour develops.

Received June 18, 1957

インシュリン溶液に対するフタール酸水素カリウムの影響について

西　崎　笹　夫

On the Influence of Acid Potassium Phthalate in the Insulin Solution.

Sasao NISHIZAKI

著者はインシュリンの澄明な酸性溶液にフタール酸水素カリウム溶液（以下「フ.水.カ」と略す）を加えると白色沈澱を生ずることを認め（実験1参照），この沈澱物をアセトン，エーテルで乾燥したものは分解点，窒素含量はインシュリンとほとんど差はないがその力価は約半分であつた．

実験1　沈澱の生成条件の検討

牛インシュリン結晶（23.4 u/mg）を日局記載のインシュリン溶剤で 20 u/cc に溶かし（pH 2.7），その 5 cc をとり M/5「フ.水.カ」（pH 4.0）0.05 cc 加え2分後の濁度をコタキ光電比色計で 750 mμ で測定後直ちに pH を Beckman ガラス電極で測定した．5分後再び M/5「フ.水.カ」0.05 cc 加え前記同様の操作をくり返した．(Fig. 1 参照)．

次にpHを一定にするためインシュリン溶液と「フ.水.カ」にごく微量の水酸化ナトリウム液，塩酸を入れて共に pH 3.72 に調節し前と同様操作をし，グラフ上で比較した（Fig. 1参照）結果両者の差はわずかであるから実験誤差の範囲内にあると考えた．

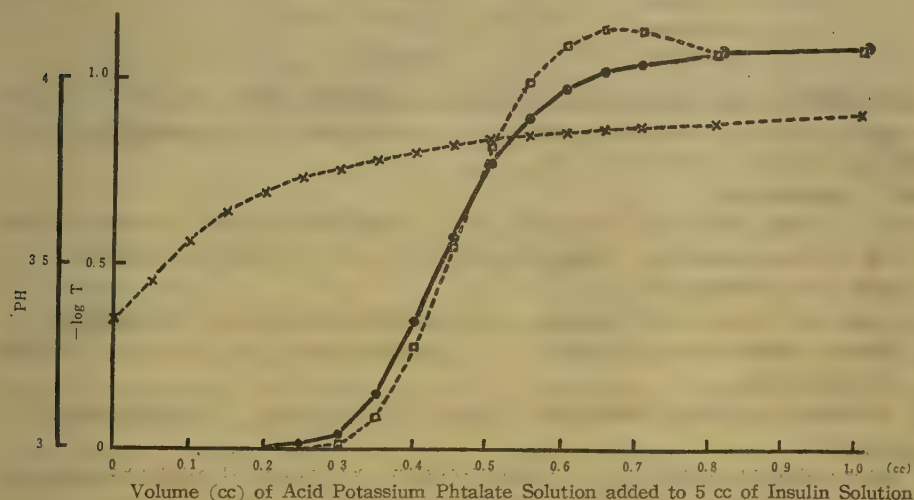



Fig. 1.　Turbidity and pH curves : When Acid Potassium Phthalate was added to Insulin solution. (Turbidity measured at 750 mμ.)

------□------ :　20 u/cc× 5 cc of Insulin sol. +M/5-Acid Potassium Phthalate.
------×------ :　shown pH in above Experiment.
—— • —— :　20 u/cc× 5 cc of Insulin sol. +M/5-Acid Potassium Phthalate. (at pH 3.72)

次にインシュリンと「フ.水.カ」の濃度の影響を検べるためインシュリン：20u/cc, 10u/cc,「フ.水.カ」$^{2}/_{5}$M, $^{1}/_{5}$M につき前と同様に操作した結果を Fig. 2 に示す.

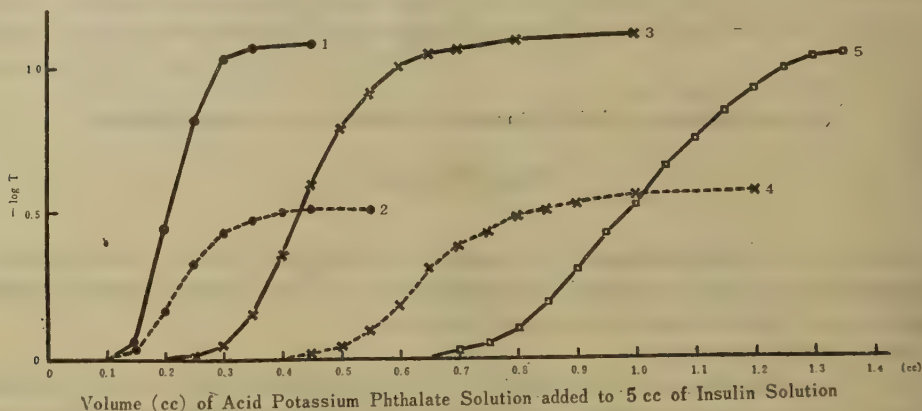



Fig. 2　Turbidity curves : When Potassium acid Phthalate was added to Insulin solution. (Turbidity measured at 750 mμ.)

—— • —— 1 : 20 u/cc× 5 cc of Insulin sol. +2M/ 5 - Acid Potassium Phthalate.
------ • ------ 2 : 10 u/cc　〃　+　〃
—— × —— 3 : 20 u/cc　〃　+M/ 5　〃
------ × ------ 4 : 10 u/cc　〃　+　〃
—— □ —— 5 : 20 u/cc　〃　+M/10　〃

これらの沈澱を遠心分離した残留物に蒸留水約 5 ccを加えると沈澱は澄明に溶けた．さらにM/ 5「フ.水.カ」を加え沈澱を生成せしめこれにN-塩酸，N-水酸化ナトリウムを少量ずつ注意しながら加え沈澱を溶かした．溶けた限界の pH は pH 2.6 および pH 5.9 であつた．

実験 2　沈澱乾燥物の検討

牛インシュリン結晶（23.4 u/mg）を日局記載のインシュリン溶剤で 40 u/cc に溶かし，その 25 cc をとり M/5「フ.水.カ」10 cc を加え放置した．5 時間後遠心分離しアセトン・エーテルで乾燥した（41.5 mg）.

この乾燥上につき次の実験を行つた．

1)　分解点：228° で褐変し，237° で黒変収縮し，241° で膨潤発泡し完全に分解した（日局の方法による）.

2)　窒素含量：乾燥物 16.5 mg を日局記載のインシュリン溶剤 5 cc に溶かし，セミミクロケルダール法で測定し，（N）14.12％を得た．

3)　動物実験による単位の検定：Marks[2] 法により測定し，11.7 u/mg を得た．この値は原料の結晶インシュリンの$^{1}/_{2}$である．

4) 等電点：乾燥物は日局記載のインシュリン溶剤に全く溶ける．また前記同様 pH の移動による沈澱の生成を検べた結果その限界はpH 4.3，pH 7.7を得た．その過程で最も濁度の高いのは pH 6 附近であつた．（インシュリン結晶の等電点は 5.25 である）.

文　献

1) 日 局 Ⅵ ; 59.
2) Marks, H. P. : The Health Organization of the Leaque of the Nations 1926, Biological Standardization of Insulin, 1957.

Received June 18. 1957

印度蛇木及び二三近縁種の染色体数

川谷豊彦，宮崎幸男，大野忠郎

Chromosome Numbers of *Rauwolfia serpentina* BENTH. and Some Allied Species

Toyohiko KAWATANI, Yukio MIYAZAKI and Tadaro OHNO

印度蛇木 *Rauwolfia serpentina* BENTH. はキョウチクトウ科に属する灌木で，東南アジアの熱帯亜熱帯地方に野生する．最近この植物の主として根に主有効アルカロイドたるレセルピン其の他が発見され，その生薬，エキス，又は抽出アルカロイドは血圧降下剤，精神安定剤として広く賞用されている．

Rauwolfia 属には約 120 の種があるが，染色体数の知られているものは未だ一つもないようである．著者等は1954年以来，パキスタン産，タイ国産，インド産の *R. serpentina*，香港産 *R. verticillata* BAILL.，南アフリカ産 *R. caffra* SOND. の種子を入手して栽培し染色体数を決定し得たので，その結果をここに報告する．

染色体観察には，*R. serpentina* 及び *R. verticillata*は伊豆薬用植物栽培試験場において栽培中のものを，又 *R. caffra* は春日部薬用植物栽培試験場において栽培中のものを用い，TJIO & LEVAN (1950) の方法で処理した根端細胞を用いた．ただし，8-oxyquinoline (0.002 mol.) 液処理は 6 時間，加水分解は N-HCl 60° にて 12 分，染色はacetic orceinによつた．

Chromosome Numbers of *Rauwolfia*

Name of plants	Somatic chromosome number	Seed origin	Figure	Ratio of magnification
R. serpentina BENTH.	22	Pakistan (1954)	1	1220
〃	22	Thai (1955)	2	1350
〃	22	Darjeeling, India (1955)	3	1320
〃	22	Dehra Dun, India (1957)	4	1350
R. verticillata BAILL.	22	Hong Kong (1956)	5	1370
R. caffra SOND.	44	U. S. Africa (1956)	6	1450

得られた結果は表示の通りで *R. serpentina* $2n=22$，*R. verticillata* $2n=22$，*R. caffra* $2n=44$ と決定された．従つて *Rauwolfia* 属の染色体の基本数は 11 である．

本研究を実施するに当り種子を分譲されたタイ国，インド国デラダン林業研究所，同ダージリンG. Ghose商会，香港植物園，南アフリカ聯邦国立植物園の当局，並にパキスタンN. A. Qazilbash教授に敬意を表する．

Summary

No species of *Rauwolfia* seems to have been known so far of chromosome numbers. The authors have determined the somatic chromosome numbers of *Rauwolfia serpentina* BENTH., *R. verticillata* BAILL., and *R. caffra* SOND. are 22, 22, and 44, respectively. It has been shown for the first time that the basic number of *Rauwolfia* is 11.

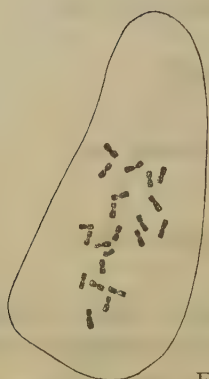
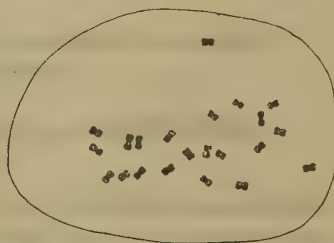



Fig. 1 Fig. 2 Fig. 3

Fig. 4 Fig. 5 Fig. 6

^{60}Co照射による医薬品の滅菌

岩原繁雄，栗栖弘光，越沼きみえ，
中村正夫，山地幸雄，志波　剛，
石関忠一，小島秩夫

Sterilization of Medical Drugs by ^{60}Co Irradiation.

Shigeo IWAHARA, Hiromitsu KURISU, Kimie KOSHINUMA,
Masao NAKAMURA, Yukio YAMAZI, Tsuyoshi SHIBA, Chuichi
ISHIZEKI and Tsuneo KOZIMA

放射能による滅菌法は食品の保存の面で脚光を浴びているが，医薬品の滅菌についてはさらに有望と考えられる．その理由として，風味の変化を気にしないでよいこと，食品に比べて一般に成分が簡単であるから照射による変質の状況をとらえやすい，比較的高価で，容積もわりあい小さいから経済上の面で食品より有利なことが多い，などがあげられる．特に我が国においては食品の製造業者のうちにはきわめて零細なものが多く，それらの製品を適当な場所にまとめて放射能滅菌を行うとなると輸送の面でもいろいろの問題が生じるであろう．

我々は^{60}Coを用いて，薬品の滅菌を行うために必要な基礎的研究を行つており，二三の実験を試みたので参考のため発表する．

〔実験結果〕 主として酵母菌を含有する40%ブドウ糖水溶液を^{60}Coで照射したばあい，330,000γで菌数は1/1000に減少した．

アンプルに封入された未滅菌のブドウ糖注射液，ザルソブロカ糖注射液の細菌数を測定した結果，40アンプルのうち35アンプルは1 cc中に含まれる細菌数が1個以下であり，5アンプルからは1 cc中100個以上の細菌が検出された．

簡易無菌操作法で製造されたビタミンB_{12}注射液15アンプルのうち1個/2 cc以下の菌数のもの13アンプル，100個/2 cc以上のもの2アンプルであつた．

ブドウ糖原末（注射薬製造用）10検体の細菌数をしらべた結果，すべて1 g中200個以下であつた．

要するに無菌操作法によつて製造される注射液中に含有される生菌数は概して少ないようであるから300,000～1,000,000γ程度の照射によつて滅菌されると考えられる．なお大量照射の結果としてアンプルに淡褐色の着色がみられた．

^{60}Co照射によつて注射薬中に含まれる発熱物質が破壊されれば大変好都合であろうと考え，細菌性発熱物質(赤痢菌内毒素）の水溶液を450,000γ照射したが，力価の低下はみとめられなかつた．

^{60}Coによる滅菌の実用化試験の1つとして腸線の滅菌を行つた（腸線の理想的な滅菌法はいまだ確立されていない)．ガラスアンプルにつめた未滅菌の腸線縫合糸（馬腸線）を照射したさい，110,000γでは滅菌は不完全であつたが，5,250,000γの照射では無菌試験の結果，滅菌が完全であることが証明された．しかし抗張力の低下がみとめられたので中間の線量による実験を繰りかえす必要がある．

今後の課題として，種々の薬品を^{60}Coで照射し，その変質の有無を研究し放射能滅菌に耐えるかいなかを検討する必要がある．

この研究は長沢部長の御援助を得て行われた．また^{60}Coによる照射は国立東京第二病院の御厚意によつた．

Received June 18, 1957

黴の免疫学的研究
ゲル内抗原抗体反応（Ouchterlony法）による黴の分類について

中村正夫，宮沢文雄，上山栄一
八田貞義*

Immunological Studies on Fungi.
Classification of Fungi by Antigen-Antibody Reactions in Gels (Ouchterlony Method)

Masao NAKAMURA, Fumio MIYAZAWA, Ei-ichi UEYAMA and Sadayoshi HATTA

先に我々は黴特にPenicillium属を用いて免疫血清をつくり，これと菌体成分或いは培養沪液との沈降反応及び凝集反応を行う事によつて，黴種の鑑別を試みた．一般に黴類は類属反応が強く鑑別は困難であるが，抗原吸収法により，ほぼその目的を達した．併し吸収する事により血清の力価は低下し，吸収血清による分類方法は充分満足できるものではない．我々は今回ゲル内抗原抗体反応特にOuchterlony法を応用して黴種の鑑別を試みた．

実験方法　：Ouchterlony法はWilson等が記載している方法に準じて行つた．抗原としては試験管内沈降反応の場合と同じく15～30日培養の沪液を用いた．血清は前回報告の家兎免疫血清を使用し，37°Cに放置して1週間後の結果を観察した．

実験成績　：第1図はP. purpurogenumとP. islandicumについて行つた実験である．すなわち，basin Ⅰに前者，basin Ⅱに後者の培養沪液を入れ，basin ⅢにP. islandicum免疫血清を入れた．その結果，この二種の黴の有する共通抗原によつて，両者に共通な，Ouchterlonyのいう所謂interferenceを形成した沈降帯と，それ以外にP. islandicumにのみ有する抗原の為にbasin ⅡとⅢの間には特有な別の沈降帯を認める事が出来た．この様にして黴種の異同を比較的簡単に観察する事が出来た．

Fig. 1. Precipitation Patterns.
Ⅰ. P. purpurogenum culture filtrate (left)
Ⅱ. P. islandicum culture filtrate (right)
Ⅲ. P. islandicum immune serum (bottom)

更に我々は分離された黴を出来るだけ速かに同定する目的をもつてCzapek平板培地上でOuchterlony法を行つた．すなわち，Czapek平板に免疫血清を入れるbasinを作り，これから一定の距離に既知の黴と，同定しようとする未知の黴とをうえ，3～5日間25°Cに培養する，充分発育した時に既知黴の免疫血清をbasinに0.2～0.3ml入れ37°Cに放置すると，24～48時間後に沈降帯を認める事が出来，短時日の間に同定出来る事を観察した．

なお，重層法による試験管内沈降反応により，P. islandicum血清に対する抗原価8以下を示した．P. chrysogenum, P. toxicarium, P. citrinum. 培養沪液とは，いずれもこの方法によつて沈降帯を認める事が出来なかつた．

考察：黴の免疫学的反応は，いずれも類属反応が強く，抽出菌体成分の分析についても，一般細菌に比較して複雑であるため．簡単な操作によつてこの抗原構造を検討し，或いは抗原分析を行う事は困難である．

* 日本医科大学衛生学教室

また前報で述べた如く，沈降反応，凝集反応を行うに当つても反応用抗原がつくり難い， Ouchterlony 法では単一抗原抗体系は一本の沈降帯を生ずるとされている．複合抗原抗体系では その数に応じて沈降帯が現われ，しかもその沈降帯は抗原抗体の濃度や最適比の 差異によつて異つた位置に生ずるので， 異つた二種の黴が共通抗原を持つておれば， 両者に共通の沈降帯と， それ以外に種特有の抗原に対する沈降帯を示す事になる．すなわち，interference を形成しない沈降帯を生ずる．

この方法を応用して黴種の鑑別のみならず，複雑な黴の抗原構造についても検討を加えたいと考える．

Received June 18, 1957

せん維素グリコール酸ソーダに関する細菌学的研究

岩 原 繁 雄, 赤 坂 京 子

Bacteriological Studies of Carboxymethylcellulose Natrium.

Shigeo IWAHARA and Kyōko AKASAKA

CMCを主剤として製造されたカラー糊が夏季の高温時に粘性を失うことがあるが，この現象が，微生物の作用によるものであることを証明することができた．すなわちカラー糊の製造にあたつてあらかじめ0.1%ホルマリンを加えておくことによつて液化が防止されることがわかり，また粘性を失つて殆んど水様となつたカラー糊4検体から普通寒天培養によつて各1株ずつ計4株の細菌を分離することができた．これらの菌を固形培地からかき取つて，滅菌した濃厚CMC水溶液（小試験管に分注）に穿刺し37°Cに保つと24時間以内に穿刺部位の液化がはじまり，5日後には試験管内容全体について著明な液化がみられた．さらに菌量の多少と液化の程度との関係を知るために，種々の菌量を接種して比較したが，CMCに10^8個/ccの割合に菌を加えると3日後に殆んど水様となるにも拘らず，10^5個/ccでは6日後にも粘度の低下は殆んどみられなかつた．しかし，CMCをブイヨンで溶かしたものに10^5個/ccの菌を接種した場合には菌の速やかな増殖が認められ，2日後には殆んど水様となつた．なお，CMC水溶液に10^8個/ccに大腸菌を混じた場合にも著しい粘度低下がみられたが，ブドウ球菌の場合には6日後にも菌を混じない対照とほぼ同程度の粘度を保つていた．以上のような実験を製品をかえて行つてみたが，製品による差はあまり明瞭でなかつた．

製品検査のため当所食品添加物部に呈出されたCMC 7検体につき混入生菌数を測定した結果1検体について900個/gの細菌数が認められたが，他の6検体はいずれも100個/cc以下であつた．

以上の実験からCMCだけの水溶液では，よほどたくさんの菌が混入しない限り，著しい粘度低下を来すことは考え難いが乳製品，野菜，肉などのように菌の増殖を許すような物質の中にCMCが，混ぜられさらにCMC液化能を持つ細菌の汚染をうけるとCMCの粘度低下が起りうると考えられる．

この実験は藤井(清)，原田，朝比奈(正)技官の御援助をうけて行われた．

Received June 18, 1957

抄　　録

感冒薬（混合製剤）の試験法における二三の知見．
板井孝信，神谷庄造：第10回日本薬学大会（昭和32年4月9日）にて講演
これは，板井，神谷：混合製剤の分析に関する研究，第1報（薬誌 77，554（1957）第2報の一部を報告した．

ピコリールエーテルのナトリウムアミドによる転位反応 I
鈴木郁生：Pharm. Bull., 4, 211（1956）
アルキル又はベンジールピコリールエーテル（α又はγ）をデカリン，キシロール，又はベンゾール中ナトリウムアミドを作用させると，アルキル又はベンジール（α又はγ）カルビノールを得る．これはピリジン環の窒素の極性効果によつてCarbanionが生じこれが転位基の電子密度の低い部分を攻げきし，転位が行われるものであることを示す．エチル，ベンジル，第二級ブチル（α又はγ）ピコリルエーテルではカルビノールに転位するが，エチルβ-ピコリールエーテルでは転位は行われないがこれは窒素の効果が少いためである．又フェニル（α又はγ）エーテルでも転位を起さないが，これは電子密度の低い炭素を作らないためである．ベンジルピコリールエーテルではCarbanionはピリジン環に直結した炭素に生じ，転位体はベンジル（α又はγ）ピリジルカルビノールである．

ピコリールエーテルのナトリウムアミドによる転位反応 II
鈴木郁生：Pharm. Bull., 4, 479
アリルピコリールエーテル（α又はγ）にベンゼン中ナトリウムアミドを作用させると，アリルピリジルカルビノール（α又はγ）を生ずる．同種の反応をキシロール中130°～140°で行うときは，γ体では得量を増しα体では粘性の少い油を得る．この油はn-プロピルピリジルケトンであつた．これはγ位よりα位の方が二重結合が共範系に移行するある因子が大なるためと思われる．

有機硫黄化合物の赤外線吸収スペクトル
大場琢磨　第10回日本薬学大会シンポジウム講演（昭和32. 4. 9.）
(1)　S－Hの特性吸収は通常3.85～3.92μに弱い吸収を示し，見のがし易いが，polarなチオカルボン酸やチオフェノール等では相当強く現れる．2-Mercaptothiazoline，2-MercaptobenzthiazoleのIRにはSHの吸収がなく3.2μにNHの吸収があるので，これ等は通常の状態ではチオケト型で存在し，4-Dimethyl 2-mercaptothiazole及4-Phenyl 2-mercaptothiazoleのIRはSHの吸収が存在し，チオール型であるといわれている．しかしQuinolineの2-及4-mercapto体のIRからはそれらがSH型かC＝S型かを決定出来なかつた．
(2)　C＝S　Colthup, Thompson等は7.14～7.69μの領域を特性波長域としているが，詳細なデーターはなく，Sheppard, Bellamy等は有用なものがないと述べている．Mercaptothiazoleの7.60μの吸収は，そのチオケト型がこわれている鉛塩にもあり，Dibenzthiazolyl disulfideにも7.63μの吸収がある．又5,6 Dihydrothiouracil, Thiobarbituric acidの7.52，7.39μの吸収は，5,6-Dihydrouracil，Barbituric acidにも存続している．ヂチオ醋酸，エチルキサントゲン酸カリのIRを測定したが，7.14～7.69μの領域にはそれらしい吸収はなかつた．
(3)　>SOは9.43～9.62μに通常300のorderの分子吸光係数を有する吸収をもち，>SO_2は7.41～7.69μ及び8.62～8.93μにそれぞれ分子吸光係数250～600及び500～900の強い吸収をもつている．Cymerman等は従来Disulfoxide型として考えられたものがIR測定の結果，Thiosulfonate型であることを発見した．9種の4-Pyridyl置換sulfone, sulfoxide及びsulfide化合物についてIR測定（固体状態）の結果，大体同じ領域に吸収を認めた．sulfoneの第1波は7.6μで位置が安定しているが，第2波は8.5と8.7μとで移動していた．クロロホルム溶液状態では，第1波のみ，0.14μ短波長側に移動していた．

混合製剤の分析に関する研究（第1報）フェナセチンのインドフェノール生成による定量
板井孝信，神谷庄造：薬誌，77，554（1957）
フェナセチン（アセチルフェネチジン）を臭化水素酸と煮沸し，p－アミノフェノールとし，水でうすめて，0.1N水酸化ナトリウムアルカリ性とし，o－クレゾールを加えて，インドフェノールとして定量した．吸収最大605mμ.，フェナセチンの濃度1～5γ/cc.±2％の精度でミクロ定量が可能である．サリチル酸フェニルを含有する場合は，o－クレゾールの代りにフェノールを作用させて，同様にインドフェノールとする．620mμ．本定量法はアセトアニリド，アセチル

サリチル酸，カフェイン，塩酸デフェンヒドラミンを共存するも妨害されない．

邦産リンドウ科植物生薬中のアルカロイド Gentianine の分布

柴田承二，藤田路一，井下田浩，薬誌，77，116（1957）．

邦産リンドウ科植物，エゾリンドウ *Gentiana axillariflora* LEV. ET VNT. の根，チョウセンリンドウ *G. scabra* BG. の根，及びセンブ *Swertia japonica* MAKINO（当薬）等の生薬をアンモニア性クロロホルムで抽出した結果，アルカロイド Gentianine をそれぞれ 0.15，0.05及び0.76％の収率で得た．又ペーパークロマトグラフィにより本科植物の腊薬について screening test を行つた結果15種のうち10種のものに本アルカロイドの存在を認めた．

大腸菌のアミノ糖代謝の研究（第3報）グルコサミン-6-燐酸の脱アミノ

山羽　力，朝比奈正人：生化学，28，486（1956）．

Escherichia coli 凍結乾燥菌の抽出液から，硫安分画沈澱および燐酸カルシウムゲル処理で，グルコサミン-6-燐酸脱アミノ酵素を部分的に精製した．この酵素によりアンモニアがとれた後の生成物を分離し，その中にペーパクロマトグラフィおよびイオン交換樹脂クロマトグラフィでグルコース -6- 燐酸とフラクトース -6- 燐酸の存在を確認したが，この中のいずれが最初の生成分であるかは明らかにし得なかつた．なおこの酵素の至適pH は7.0，至適温度は 50° であつた．この酵素は脱アミノに酸素を必要とせず，又 Zn^{++} で特異的に阻害される．

非水溶液滴定による医薬品の定量（第11報）プロピオン酸を溶媒とする有機塩基の塩の滴定に及ぼす酸の影響について

鹿島　哲，加納宏一郎：薬誌，76，931（1956）．

有機塩基の塩を水を含まないプロピオン酸を溶媒として過塩素酸で直接滴定するとき，その塩を構成している酸がその滴定にいかなる影響を及ぼすかを，ジフェンヒドラミンの種々の塩をガラスー甘汞電極を用いて滴定した結果に基ずいて検討した．それらの滴定曲線から無機酸はかなりの影響を及ぼし，滴定精度を低下させるが，有機酸はピクリン酸，修酸及びマレイン酸を除いてはその影響は僅かであつた．プロピオン酸溶媒中での酸の強さは水溶液中での強さと，ピクリン酸を除いては，その順序はほとんどかわらないから水溶液における酸の強さで表現すると，その pK が3より大きい酸はこの滴定にほとんど影響を及ぼさないが，それより強い酸はその測定精度を低下させるといえよう．またこの方法によりプロピオン酸中での酸の強さの比較ができるが，その強さの順序は氷酢酸を溶媒とした場合と大差がなかつた．

Quantitative Determination of Morphine in Opium by Paper Chromatography and Spectrophotometry

Haruyo ASAHINA and Masako ŌNO

Bull. Narcotics, United Nations 8, No. 4, 39-44 (1956).

沪紙クロマトグラフィーにより沪紙上に展開したモルヒネを，そのまま沪紙上で吸光度を測定し，簡単にあへん中のモルヒネを定量することができた．

この方法により，採汁回数別にあへん中のモルヒネを定量，比較した．

採汁を繰返すとあへん重量は減少し，モルヒネ含量は第1回目が高率の場合には Annett，町口氏の示したとおり規則的に低下するが，最初が低率の場合は，僅かであるが増加することがあつた．しかし回数別のモルヒネ量を計算すると，殆んどすべての場合，採汁回数が多くなるにつれて明かに減少した．

日本産のあへんがトルコ・ユーゴ・ギリシャ・ブルガリヤ諸国産のものに比べてモルヒネ含量が低率なのはこれらの諸国ではけし果実を1回しか傷つけないのに反し，わが国では数回繰返すためと思われる．一例をあげると和歌山試験場で栽培した「一貫種」のモルヒネ含量は，第1回目には24.8％，21.4％のごとく20％以上であつたが，4回採汁を繰返して混合したものは17.5％であつた．

なお春日部試験場で栽培した「一貫種」の果実個別のあへん 82 例の重量，及びモルヒネ含量と，*Papaver setigerum* DC. よりのあへんのモルヒネ含量を報告した．

合成麻薬（モルヒナン系麻薬）の試験法について

朝比奈晴世，水町彰吾：昭和30年度厚生科学研究報告医薬品の試験法に関する研究　その2，麻薬試験法に関する研究，東京医薬品工業協会．

l-3-Hydroxy-N-methylmorphinan（I）について呈色反応など性状を確かめ，比旋光度，吸収スペクトルの測定，比色定量，沪紙クロマトグラフィーを行い，d−メトオキシ誘導体（II）と比較した．

1)（I）は苛性アルカリに溶ける．塩化第二鉄試液により呈色せず，又五酸化ヨウ素を還元しない．

2)（I）に対するモリブデン酸硫酸液の反応は特異的で，ホルマリン硫酸液の反応は，やや特異的である．

(II)に対しては，亜セレン酸硫酸液の反応がやや特異的である．

3) (I)，(II) の沪紙クロマトグラフィーの展開液としては，n−ブタノール：氷酢酸：水＝5：1：4が適し，そのスポットはヨウ化カリウム-塩化白金試液で，いずれも紫色を示す．又東洋沪紙 No. 50を用いるとき．Rf 値はそれぞれ (I) 0.86，(II) 0.93であつた．

4) N. N. R. による比旋光度測定法，比色定量法には若干の改良を要する．

医薬品の螢光分析に関する研究（第1報）粉末医薬品の螢光測定

太幡利一，市村陽二，薬誌，76，1031−1034 (1956)

著者等は有機化合物に一定波長の紫外線を照射するとき，発する螢光の強度と色調が物質の化学構造と関連することに着眼し，螢光の強度，及び波長を測定する方法を考案し，これにより医薬品類の異同，純否を鑑別する一助とし，又有機化合物の化学構造の研究に寄与せんことを企図した．

先ず第一段階として写真フィルムの黒化度による螢光強度の測定を試みた．その装置を略記すると，試料に輻射光（マツダSHL100UV超高圧水銀燈）を照射して生ずる螢光を輻射光の影響を除き(AKA−UV−Oフィルター）レンズ等の光学系を一切使用せず直接記録する装置である．

以上の装置により螢光を記録したフィルムを著者等の改良した現像液により現像し，定着した後，このフィルムの黒化度をベックマン分光光度計を用い，波長610 mμ で黒化円の直径を縦断する光束を照射して得られた吸光度を全黒化度の代表値とした．

黒化円の透過率(T%)をとると黒化度と試料濃度との間にゆるやかな曲線状を示すが，吸光度($-\log T$)をとれば相互の差が約0.1の更にゆるやかな曲線を示した．この稀釈率は 2^n と考えることが出来るから．その指数 n を横軸にとり，一方に$-\log T$をとれば黒化度は或る範囲内では，直線性が成立する．

又同一条件下で曝光したものについて，その再現性を検したところ，充分あることを認めたので次報より一般的な各種試料についての実験結果について検討する．

医薬品の螢光分析に関する研究（第2報）生薬類の螢光強度及び螢光色

市村陽二，太幡利一，薬誌 76，1087−1089(1956)

著者は第1報で，医薬品類の固体状態における螢光を写真フィルムに感光させる装置，及びその螢光強度測定方法について報告したが，本報は生薬類約 100種についての実験結果を報告する．

生薬類に含有される螢光成分は単一でない．すなわち乾燥，保存等により安定に混在するものは葉緑素，或いは多くの有効成分であるが，アルカロイド，サポニン，アンスラキノン等を有効成分とする生薬類はこれらの成分の螢光を含めた螢光色を示すので，生薬類の鑑別，又は有効成分の多少を知るための簡便な手がかりとなり得る．特に後者と生薬の螢光色，及びその強さとの間には密接な関係があるものと考えられるので，これらについては別にペーパークロマトグラフィー等の処理により検討を加えつつあるが，本報は螢光色及び強度について各有効成分別に分けて検討を加えた．

生薬の粉末をシリカゲル除湿器中に24時間乾燥したものについて，第1報の装置により螢光強度を記録した． 表中視感度による値は第1報の分類法により，写真法との相違を知る参考のために記録した．又螢光色については螢光分光光度計によりくわしく検討を加える故通常の色名を附記したが，生薬類はその螢光成分が複雑で，従つて螢光色も形容し難いものが多かつた．

医薬品の螢光分析に関する研究（第5報）ビタミンB_2の螢光強度について

太幡利一，市村陽二，河合　斉

講演要旨

第9回　日本薬学大会

前報で報告したもののうち，ビタミンB_2は試料毎にその螢光強度に著しい差を生ずることを知り，その原因を検討するため，演者の一人が考案した沪紙上螢光物質直接定量装置の光学系と同一装置により，受光部分は2次電子増倍管（931A）を用い，一段増巾を行い60μAを直読する．所謂粉末螢光度測定測置を考案し，14 種のビタミン B_2 純結晶について結晶顕微鏡写真をとり，その結晶形，結晶の大きさについて検討を加え，更に水分，融点，乾燥，条件等の変化による螢光度の変動をも測定し，各々に関係のあることを認めた．

医薬品の螢光分析に関する研究（第6報）展開沪紙上の螢光によるベルベリンの直接定量について

太幡利一，市村陽二

講演要旨

第10回　日本薬学大会

生薬成分中のベルベリンの螢光定量を行うに当り，ベルベリンの発螢光性に関する理化学的性質を検討するため，ベルベリンの溶液における場合と，沪紙上に

おける場合の螢光色を測定すべきであると考えたので，各々の螢光スペクトルをモノクロメーターに RCA 1P21を組合せた螢光分光光度計で測定した．又その螢光の水銀輝線各波長に対する励起度を水銀輝線 365mμ，405mμ，436mμの各々又はその全部を透過し，他の可視水銀輝線を透過しないフィルターを用いて測定した所，436mμの輝線を照射することにより，白青色不純螢光は消光して，ベルベリンの螢光のみを取出し得ることを認めた．

なお，螢光選択フィルターは溶液には$AKA-VU-O_2$及び$V-B_2$を組合せて用い，沪紙上螢光は$AKA-UV-O_2$と 550mμ±12mμ 透過の干渉フィルターを用いればよい事も認めた．

本法によりオウレン，オウバク中の水性抽出液をペーパークロマトグラフィーによつてベルベリンを分離し，沪紙を乾燥後，沪紙上の黄緑色螢光を誘出操作することなく，直接定量し得る事を確認した．

着色物質を含むビタミン製剤中のビタミンCの定量法

平岡栄一：ビタミン 12，269（1957）．

著者は前報[1]において，還元性安定剤を含む製剤中のCをH_2O_2を併用するインドフェノール滴定法により正確に定量しうることを報告したが，Cは市販混合綜合ビタミン剤においてB_2と共存し，また錠衣に着色料を使用している例もあるために，かような試料中のCを定量しようとするときにはインドフェノール滴定法の終末点が不明瞭になることが多い．著者はこれらの製剤に対して，これまで着色した食品抽出液中のC定量に用いられてきたインドフェノール．キシレン抽出法を追試検討して若干の改良を行い，前記着色性製剤のみならずミネラル含有製剤にも応用しうる定量法を確立した．

1)　ビタミン 8，137（1955）．

ミネラルを含むビタミン製剤中のビタミンC 定量法

平岡栄一：ビタミン，12，272（1957）．

金属イオンの共存するときCは定量操作中にかなり分解されるといわれる．また鉄イオンなどは単独でもインドフェノール色素液を消費するために通常のインドフェノール滴定法に対して著しく影響を与えることも知られている．従来分解抑止性の抽出剤としてメタ燐酸，蓚酸，酢酸などが推奨されてきたが，EDTAやポリメタ燐酸などもこれらの金属と結合物をつくることが知られているのでCの抽出剤としての効果を検討した．またミネラル共存試料に対してヨウ素法，インドフェノール滴定法，インドフェノール・キシレン抽出法及び2-Nitro-4-methoxy-aniline法による比較を行つてその優劣を検討した．

乳酸菌の代謝拮抗に関する研究

小川俊太郎，平岡栄一

日本ビタミン学会第7回例会（昭和31. 9. 22）講演

5種乳酸菌のうち4種は2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethyl-pyrimidine（OMP）により著明に増殖の阻害をうける．この阻害は菌の濁度で測定しても酸生成量で測定してもほとんど変らない．OMP類似体である11種のピリミジン誘導体については OMP 阻害は 2-Methyl-4-amino-5-bromomethyl-pyrimidine（BMP)のみ著明である．INAHについて同様の実験を行うと5種乳酸菌全部に阻害が起る．4-Desoxypyrimidine及びPASについては5種乳酸菌のどれにも阻害がみられない（1mg/管）．つぎにB群ビタミンを添加してこれらの阻害の回復をみたところOMP, BMP, INAHともにB_6群のみにより強く認められた．またその強さは一般にPyridoxal＝Pyridoxamine＞Pyridoxineの順であつた．

Toxopyrimidineおよびその関連物質のTryptophanaseに及ぼす影響　　平岡栄一

日本ビタミン学会第9回大会（昭和32. 5. 1）講演

2-Methyl-4-amino-5-hydroxymethyl-pyrimidine（OMP）及び INAHが乳酸菌の増殖を阻害し，この阻害はB_6群により特異的に回復されることを前に報告した．またB_6を含む酵素系のある種に対しても，かような事実が認められている．著者は同じくB_6酵素の1種である大腸菌の生菌Tryptophanaseに対して同様の所見がえられるかどうかを検討した．INAHについては乳酸菌増殖実験におけると同様に阻害はB_6群のみにより特異的に回復されたが，OMPでは全く回復されなかつた．また各種金属イオン添加によつてもほとんど回復効果は認められなかつた．4-Desoxypridoxine は OMP や INAH と同程度の濃度でこの酵素を全く阻害しなかつた．

分光反射率測定の分析的応用に関する研究（第6報）クロロフィル量と沪紙クロマトグラム斑点の分光反射率との関係

山口一孝，福島清吾，伊藤みよ子：

薬誌．76，339（1956）．

著者等は前報で染色沪紙の分光反射率と色素量及び色素点滴沪紙の分光反射率と色素量の間に定量的関係のある事を報告したが，今回は沪紙クロマトグラフィーを行つた際の有色斑点につき，それらの関係を検討する目的で，水溶性銅クロロフィルナトリウム塩（以

下クロロフィルと呼ぶ）について実験を行つた．その結果一定限界内でクロロフィル量の平方根と 2－log R（R：分光反射率）の間に前報と同様な近似的直線関係を見出した．最近 Mc Cready 等は糖類の沪紙クロマトグラフィーの斑点で，糖量の対数と分光反射率との直線関係につき報告しているが，本法と同様実験的な結果を裏付ける理論的な根拠は明らかとされていない．両者何れが適当であるかは将来検討を要する．なお，クロロフィルの沪紙クロマトグラフィーはtailingの除去，展開中の分解防止等の問題につき更に検討を要し，本実験例をもつてクロロフィル定量に関する決定的な成績とは認め難い．

2,4-ジニトロフェニルヒドラジン試液によるサントニンの定量（第4報）水酸化カリウム液を用いる改良法

山口一孝，福島清吾，伊藤みよ子，板東きみ子：薬誌，76，951（1956）．

著者等は前報で，サントニン2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン（以下2,4-DPHと略記）のアセトン溶液に1％エタノール性水酸化ナトリウム液を加えたとき呈する赤紫色についてλ＝500mμ の光を用い吸光度を測定しサントニンを定量した成績に関し報告したが，その後多数の実験を行つた結果呈色の経時変化がやや大きく，また用いた試薬の純度によつて時に対照液及び検液に混濁を生じ，測定に支障を来たす事実を認めた．

今回この欠点を除去する目的で，0.33％水酸化カリウム水溶液の3倍容量を試薬として用いた処，対照検液共混濁を生ずることなく，また呈色の経時変化も極めて少なく満足すべき結果を得た．なお，同一濃度検体について本法の示す吸光度は前法の値に比し小さいが両法では試薬量が異なるので同一容量に換算比較するとその差は2％以下であり，従つて両法の呈色機構に本質的な差はないと考える．

2,4-ジニトロフェニルヒドラジン試液によるサントニンの定量（第5報）水酸化カリウム液を用いる改良法による各種製剤，チョコレート中のサントニン定量法及び定量成績

山口一孝，福島清吾，伊藤みよ子，板東きみ子：薬誌，76，952（1956），正誤表参照

前報に従つてサントニンを含有する各種製剤及びチョコレート中のサントニンを定量する規準を次の様に定め，これに従つて定量を行つた成績を報告した．

サントニン及びその製剤の定量

本法はビサチン，フェノバリン，カイニン酸，マクリエキス，フェニルチオウレタン，硫黄，苦楝皮等の生薬エキス等を伴う散剤，錠剤，糖衣錠，菓子剤中のサントニンの定量を行う場合に適用される．本品を乳鉢で良くすりつぶした粉末のサントニン表示量 50mg に相当する量を 100cc ナス型フラスコにとり，クロロホルム25cc（菓子剤の様に賦形薬量の多い場合は 40cc）を加え，還流冷却器を附し，水浴上に30分間微に煮沸し，冷後 100cc のフラスコ中に沪過し，沪紙上の不溶物をクロロホルム25～40ccで洗い，洗液は沪液に合し水浴上で約1ccのクロロホルムを残すまで蒸発する．残留物に2％水酸化バリウム液 15cc を加え 90°Cの水浴上で激しくふりまぜ，15分間加温する．放冷後2％硫酸で中和し（指示薬フェノールフタレイン試液を点滴）沪過した後水5ccずつで容器及び沪紙上の残留物を2回洗い，洗液は沪液に合する．この液に10％塩酸10ccを加え水浴上で10分間加温し放冷後クロロホルム30，20，10ccずつで3回抽出し，クロロホルム液を合し乾燥沪紙で沪過し水浴上でクロロホルムを留去し，最後には，なるべく低温で空気を通じながら溶媒を完全に揮散させた後残留後に2,4-ジニトロフェニルヒドラジン試液4ccを加え水浴上に1.5時間還流後水 10cc を加え，更に水浴上で20分間加熱しアルコールを揮散させた後室温に2～3時間放置し析出した赤色結晶をグラスフィルターで沪過し水10ccずつで2回洗つた後 80°C で乾燥する．これを純アセトンに溶解し100cc とした液を100倍に稀釈し検液とする．検液5cc を共栓試験管にとり，0.33％水酸化カリウム試液1.5cc を加え（計6.5cc）激しくふりまぜた後2～5分以内にベックマン光度計又は適当な光電比色計を用いλ＝500 mμ l＝1 cm で吸光度を測定する（対照蒸留水）．別に純アセトン5ccに試薬の同量を加えた液の吸光度を測定し上記の測定値から減じ，検液の吸光度 e とする．検体中のサントニンのmg数xは標準2,4-D.P.H.を稀釈して製した標準検液について同様に操作し測定した吸光度と比較するか又は次式により求める．

$$x=\frac{908e+3.52}{10}$$

チョコレート中のサントニン定量

サントニン表示量 30～60mg に対応する本品を秤り，乳鉢中で良くすりつぶし，なるべく少量の水（30cc以下）を加え再びすりつぶし糊状とし，分液ロートに移し，乳鉢は5ccずつの水で2回洗い，洗液は合し，クロロホルム30，20，10，10ccずつを用い激しくふりまぜ抽出する，クロロホルム液を合し水浴上で残液が約1ccとなるまでクロロホルムを留去する．残留物に2％水酸化バリウム液15ccを加え，激しくふりまぜな

がら90°Cの水浴上に15分間加熱した後放冷し，クロロホルム5ccを加えふりまぜ，分液ロートに移す．容器は水5ccずつで2回洗い，洗液は水層に合し，水層は2％硫酸で中和し以下サントニン及びその製剤の定量の項（前項）の「2％硫酸で中和……」以下を準用しサントニン含量を求める．

別法：サントニン表示量30～60mgに対応する本品を秤り乳鉢中で温湯少量を加えて良くすりつぶし糊状とした後クロロホルムacc（約60cc）を用い300cc共栓三角フラスコ中に洗い込み，ふりまぜ器で激しくふりまぜ抽出した後トラガント末約5gを加え再び激しくふりまぜた後5分間放置し，透明に分離したクロロホルム液のbcc（40～50cc）を量取し，水浴上で残液が約1ccとなるまでクロロホルムを留去し以下本項の「残留物に2％水酸化バリウム液15cc……」以下を準用する．別法による場合定量で得たサントニンのmg数にa/bを乗じ検体中のサントニン量とする．

クルクミン含有製剤中のサントニン定量

サントニン表示量50mgに対応する本品量100ccフラスコ中に秤り，クロロホルム25ccを加え，還流冷却器を附し水浴上で30分間加温し冷後沪過する．残渣及び沪紙を少量のクロロホルムで洗い，洗液は沪液に合し冷後沪過する．残渣及び沪紙を少量のクロロホルムで洗い，洗液は沪液に合し，その量が多いときは約20ccまで濃縮した後Brockman製酸化アルミニウムを充塡した径1cm，長さ10cmの円管中を流下させクロマトグラフィーを行う．吸着剤の上部に黄色のクルクミンが止まる．約60ccのクロロホルムでサントニンは完全に溶出されその色は無色透明である．この液は水浴上でクロロホルムの大部分を留去し，最後になるべく低温で空気を通じながら溶媒を完全に揮散させた後残留物にサントニン及びその製剤の定量の項の「2,4-ジニトロフェニルヒドラジン試液4ccを加え……」以下を準用しサントニン含量を求める．

ロウオルフィア・アルカロイドの定量に関する研究（第1報）レゼルピンの沪紙電気泳動による分離

山口一孝，庄司初枝，西本和光

：薬誌77，(4) 337（1959）；昭和31年度厚生研究報告：

Sakal, Merrill は Rauwolfia serpentina Benth. の粗エキス中のレゼルピンを沪紙電気泳動により分離定量を行つているが，著者等は同様目的のために装置を考案試作し，これを使用してレゼルピンの分離を試みた．インド薬局方により定量した際得る総アルカロイド，及びこれを緩衝液を用いて抽出し3個のフラクションに分けたものについて，同一条件で沪紙電気泳動を試みた処，総アルカロイドからは9個の斑点を検出し，これを緩衝液で抽出した場合にはレゼルピンはpH6.5でクロロホルムに移行することを認めた．各斑点の集結，分離状態，再現性は概ね満足すべきものであつた．

ロウオルフィア・アルカロイドの定量に関する研究（第2報）レゼルピンの沪紙上螢光分析について

山口一孝，太幡利一，庄司初枝，薬誌，77，(4) 341，昭和31年度厚生研究報告：

沪紙電気泳動又は沪紙クロマトグラフィーにより沪紙上に分離したレゼルピンを溶出することなく螢光分析法により直接定量を行う目的で実験を行つた．レゼルピンの各種溶媒溶液は調製直後は紫外線照射によつて螢光を示さないが，特に5N-酢酸溶液は室温で保存するに従い著しく螢光を示し且つ380mμに新しい吸収を認めるに至るがこの変化は螢光を示す物質が二次的に生成するためと考えられる．この現象はレゼルピンの沪紙上斑点でも同様に認められるが，螢光は斑点を5N-酢酸と過酸化水素の混合蒸気中で105°Cに加温するとき一層増強される事を認めた．レゼルピンの0.2～1.5γ量を沪紙上に点滴した斑点について同一処理を行つた後，試作沪紙上螢光光度計を用いて，500±50mμの螢光強度を測定した結果，レゼルピン量と螢光強度との間に近似的直線関係が成立つことを認めた．

ロウオルフィアの生薬学的検討

下村孟：昭和31年度厚生科学研究報告

Rauwolfia serpentina Benth. 及びその同属植物を公定書に収載する場合の資料として(1)近縁植物を収載する必要の有無，(2)性状及び粉末の項目に関し生薬学的検討を行つた．

(1)　現在では原植物としては R. serpentina Benth. に一応限定し他の種については別に検討するのが良いと考える．

(2)　ロウオルフィア　RAUWOLFIA

Rauwol，Rauwolfia Radix.

ロウオルフィアは Rauwolfia serpentina Benth. (Apocynaceae) の根を乾燥したものである．

性状　本品は棒状の根でしばしば曲り，且つ側根をつけ，まれに根茎又は残茎をつけている．外面は灰黄褐色～淡灰褐色でややしわより，質は粗である．外層のコルクははげて落ちやすく，皮部はややうすく木部は質が密である．横断面をルーペ視するとき，細い導管が放射状に走り，髄はなく中心部にやや太い導管を

有し，うすい師部は褐色を呈し，その外側に厚いコルク層を有する．

本品は特異の臭気を有し味は苦い．粉末(ロウオルフィア末Rauwolfia Pulverata) 本品の粉末は淡褐色を呈し灰褐色を呈し灰黄色で主として表面視多角形のコルク細胞からなるコルク層の砕片，澱粉粒を含む柔細胞，1～2個のセン孔を有する孔紋又は有縁孔道管，ややねじれた木繊維，単粒又は2～4個の複粒からなる径6～46μの澱粉粒，径3～20μの蓚酸カルシウムの単晶又は集晶を含み，まれに分泌細胞の破片を認める．

ロウオルフィア・アルカロイドの定量に関する研究中間報告データ

山口一孝，福島清吾，庄司初枝，伊藤みよ子：昭和31年度厚生科学研究報告

(1) 印度薬局方定量法によるレゼルピン検出率の検討‥レゼルピンのクロロホルム溶液を酸でふりまぜる場合，その濃度が0.5N或いは0.01N何れの場合もその93%以上はクロロホルム層に残留し，酸に移行する割合は0.5Nの場合1%，0.01Nの場合は0.2～0.6%程度に過ぎぬことが認められる．従つてMc Mullen法の処置は適当と考えられるが，一方印度薬局方による総アルカロイド定量法においてはレゼルピンの大部分はかかつて来ないものと考えざるを得ない，従つて印局による定量残渣をレゼルピン定量の試料にとることは適当でなく，総抽出アルカロイドについてこれを行うべきものと考える．

(2) レゼルピンのクロロホルム溶液における濃度－吸光度回帰方程式を次の如く定めた．

$n=12,\ x=\gamma/100cc,\ y=e$

$y=0.0002821x+0.0047$

生薬成分の分光分析

山口一孝：　第10回日本薬学大会生薬部会シンポジウム要旨　P198 (1957).

主としてサントニン，ルチン，ロウオルフィア・アルカロイド，麦角アルカロイド等の生薬成分の分光定量分析について，原理，発展過程，生薬成分微量分析えの応用，再現性の保証，ルチン，サントニン，クロセチン，ペルベリン，クロロフィリン，カイニン酸，アスカリドール，ケーリン，グルクロン酸抱合体，トロパンアルカロイド，ロウオルフィアアルカロイド，麦角アルカロイド等の定量，螢光分析法及び分光反射率測定による沪紙上直接定量等について綜説した．

民間粉末生薬の研究（5）

下村　孟：植研，31，No. 2，51 (1956)

ヨウバイ皮末　Myrica Pulverata (10)及びコウボク末　Magnolia Pulverata (11)について鏡検要素を図説し，その記載を行つた．

粉末生薬の純度測定法 Lycopodium 法及び分光反射率測定法の適応について

下村　孟：第10回日本薬学大会シンポジウム，生薬部会講演（昭32. 4. 8.）

Lycopodium 法の解説，日本産石松子 1mg 中の Spore 数の決定，センブリ末の純度測定，オウレン末の純度測定，オウレン末とオウバク末に分光反射率測定を適応した結果について詳述した．

抗生物質の腐生菌に対する作用

田中　穰，松島　崇，池田峰子：植物病理学会 昭和31年度冬季関東部会講演

Acti-Dione, Filipin, Candicidin, Rimocidin, Cathomycin mono-sodium salt, Puromycin-HCl, Anisomycin, Tyrothricin, Neomycin, Calcium oxamycin, Tetracycline-HCl, Pleocidin, Fungichromin Trichomycin, Neomycin, Bacithacin 及び Gramicidin S sulfate 計16種類の抗生物質の *Mucor, Rhizopus, Aspergillus, Penicillium, Cladosporium, Alternaria*, 等計27種類の腐生菌に対する抗菌作用を，Asparagin-dextrose agar を用い抗生物質の濃度 100 p. p. m. で調べた．その結果は Filipin, Rimocidin 及びFungichromin は殆んどの供試菌の発育をこの濃度で完全に抑制し，Acti-Dione, Pleocidin 及び Trichomycin は比較的良く抑制したが他は殆んど無効であつた．

種々の食品より糸状菌分離に用いる培地の検討

田中　穰，松島　崇，池田峰子　植物病理学会昭和31年度冬季関東部会講演

食品類より糸状菌及び酵母類等を分離する際に細菌の発生が障害となるので，糸状菌の発育のみに都合よく然も細菌の発生を抑制し得る培地が要求されるため次の試験を行つた．供試培地は，Czapek-Dox agar, P. D. A.,Waksman agar 並びに之等を pH 4 に酒石酸で acidified したもの及び 7.5%NaCl 添加のもの等計9種類；試料は市乳，チーズ，キューバ糖，輸入米である．結果は全般に acidified P. D. A. が細菌を抑え糸状菌の検出が最高であつた．然しこの培地で酵母の多く発生した材料を用いた場合に或種の酵母が先に発育して糸状菌が抑えられる例が認められた．7.5% NaCl を加えた培地では *Aspergillus glaucus* groupの

発育が特に良く，*Mucor* spp., *Rhizopus* spp. をよく抑えた．次に食品類より普通分離される糸状菌，酵母の30余種を用い，前記の培地上で発育の良否を試験したところ同様の結果を得た．

コルヒチンによつて育成したシロバナムシヨケギク（*Chrysanthemum cinerariaefolium* Bocc.）の倍数体について

川谷豊彦，大野忠郎，木下孝三：遺伝雑，31，(2)，49～53 (1956).

1) 1947年コルヒチン処理によりシロバナムシヨケギクの四倍体を創成した． 2) 四倍体シロバナムシヨケギクは二倍体に比し気孔は大きく，1視野内の気孔数は少く，花は大きく，舌状花数は多く，有意差が認められた． 3) 四倍体シロバナムシヨケギクは二倍体に比し乾花のピレスリン含量（全量）が高く，有意差が認められた．これは人為的染色体倍加によつて薬用植物の有効成分を増加せしめ，優良品種を育成し得ることの可能性を示すものであつて，注目すべき事実である． 4) ピレスリンⅠ，およびピレスリンⅡの含有量については，四倍体と二倍体との間に有意差は認められなかつた． 5) シロバナムシヨケギク乾花のピレスリン含量（全量）は貯蔵によつて減少することが推計学的にたしかめられた．

Two Further Crystalline Compounds from *Artemisia caerulescens* L.; Discovery of an *Artemisia* containing l-β-Santonin. Ⅲ.

Toyohiko KAWATANI and Silvan VODOPIVEC: J. Pharm. Soc. Japan, 76, (10), 1214-1215 (1956).

*A. caerulescens*から*l*-α-Santoninの外更に2種の結晶化合物を得た．その一つはm.p. 216～218°（エタノールから再結晶をくり返す），紫外線及び赤外線吸収スペクトル，呈色反応等から*l*-β-Santoninに一致し，混融して融点降下せず，他の一つは新化合物でPelinlactoneと命名した．ペリンラクトンは$C_{15}H_{22}O_4$，無色プリズム，m.p. 237～239°で，ミブラクトン$C_{15}H_{22}O_4$, m.p. 234～235°と混融すると融点を降下する．Artemisia 植物体に*l*-α-及び*l*-β-Santoninが同時に含まれることは始めてであり興味ある問題と思われる．

Detection of a Strain containing *l*-β-Santonin in *Artemisia Kurramensis* Qazilbash.（Toyohiko KAWATANI: Discovery of an Artemisia containing *l*-β-Santonin. *IV*）

Tatsuichiro KURODA and Toyohiko KAWATANI: J. Pharm. Soc. Japan, 76, (12), 1445-1446 (1956).

近時クラムヨモギは本邦に栽培され*l*-α-Santoninの原料植物として著名であるが，クラムヨモギに*l*-β-Santoninのみを含有する系統が発見された．詳細に外部形態を観察するに*l*-α-Santoninを含有する本来の系統と相違を見出し得ず，また染色体数は花粉母細胞でn＝9であり両系統同数である．1956年7月採集の*l*-β-Santoninの含有率は絶対乾燥重に対し0.50～1.12%であつた．本植物の実際栽培に於いて*l*-α-及び*l*-β-Santoninの何れかを含有する両系統が同一圃場に相隣つて栽培されるならば，雑種を生ずる可能性がある．この雑種が同一植物体中に両サントニンを共に含有するか，何れか一方のみか或は何れをも含有しないかを知ることは興味ある問題であろう．

α-及びβ-サントニンの投与試験並びにそのNa塩の薬効の比較について

久保木憲人，塚越油子，川谷豊彦：第10回日本薬学大会講演（昭和32年4月9日）

サントニンの異性体としてα，βがあり，この薬効を比較するために，前橋刑務所の受刑者を対象として，これを二組に分ち，一方はα-サントニン1人当り0.1g＋フェノバリン0.3g，人員30名とし，他方はβ-サントニン1人当り0.1g＋フェノバリン0.3g，人員25名として投与して，服用後21日目に其の陰転者を調べた所，α-サントニンの方は25名，β-サントニンの方は14名であつた，これを%にすればαの方は83%，βの方は56%となるが，α1回の投与で陰転率83%は経験上成績が良すぎるのであつて，更にここに推計学的検定を行うと．αとβとは有意差がないことがわかつた．なお副作用の点においては，βはαより少いことがわかつたが，α，β共何れも心配すべきものは認められなかつた．しかして著者等はβを服用した時は今迄は黄視症は無いものと考えていたが，今回の実験によればαより遥かに少いがβにも黄視症は有るようである．次にこのα,βを注射薬とするために，そのNa塩を造つて見るとα-Na塩，β-Na塩は融点それぞれ78～83°，73～74°となりα，βそのものの融点171～174°，216～218°に比較すれば，ずつと低くなり，且つαそのものはβそのものに比較して総ての溶媒に溶け易いのであるが，Na塩になるとα，β共このものの一分が三分の水に溶けるようになり，水に対する溶解度は同等に変つたのを見た．依つてこれ等を滅菌蒸留水に溶かして体重15gの雄のマウスを用い，各群6匹ずつとして，その皮下

に注射して24時間後の生存数からその LD_{50} を算出したところ Behrens-Kärber 法に依れば αの LD_{50}=24 mg，βの LD_{50}=7.25mg となり，β-Na 塩は α-Na 塩に比してその毒性は3倍以上も大なることが確められた．これは思うにα，βサントニンそのものの投与ではβの総ての溶媒に対する溶解度はαより悪く，大体βはαの$^1/_3$〜$^1/_5$の溶解度を有するも，そのNa塩となると水に対する溶解度は同等となる故そこに薬効の変化を生ずるためではなかろうか．本実験に依り，β-サントニンをそのまま経口投与する時はα-サントニンとその使用量を同一にするもその効果は同等であり，且つ何等恐るべき副作用を生ずる事は無いが，βをNa塩として注射薬とした場合，すなわちβのサントニン酸ソーダは，これを現在普通に注射薬として使用されているαのサントニン酸ソーダと同様に取扱う事は危険であると考えられる．

アヘン原料ケシの栽培法

木下孝三：農及園 31．(3)，417−422 (1956)．

ケシの品種，整地，種子の準備，播種，間引及び除草，中耕培土，肥料，摘芽，生育状況，採汁，乾燥，種子及び茎葉の始末，病虫害，病虫害の防除，栽培許可申請及びアヘン納付等の各項目につき主として昭和30年度和歌山薬用植物栽培試験場の試験成績にもとずいて平易に解説した．

有機化合物のポーラログラフによる研究(第1〜2報)
(第1報) アンブレット，ケトンおよびキシロールムスクのポーラログラフィー：

佐藤　寿：分析化学．6，81 (1957)．

0.25Mの臭化ナトリウム，0.04MのBritton-Robinson 緩衝，0.028%のゼラチンを含む80%アルコール中で上記化合物のポーラログラフィーを実施した結果，アンブレットムスク，ケトンムスクは主として2段波，キシロールムスクは3段波を示した．又これら化合物のpH−半波電位，波高，還元電子数等との関係について検討を行い，且つこれらの化合物は濃度 0.1〜1.0 mMにて定量出来ることを述べた後，各化合物の水銀滴下電極における還元機構の推定を行つた．なおアンブレットムスクの化学構造は従来の3個のニトロ基を有する構造とは異なり，2個のニトロ基を有する化学構造であることが認められた．

(第2報) ピペリンのポーラログラフィー：同上84 (1957)．第1報と同様にしてピペリンのポーラログラフィーを実施した結果，本化合物は1〜2段波を示し，又これの pH −半波電位，波高，還元電子数等との関係について検討を行い，且つこの化合物が濃度0.1〜1.0mMで定量出来ることを述べた後，本化合物の還元機構を第1報と同様 Stokes-Einstein 式より求めた拡散係数を Ilkovic 式に適用して算出した還元電子数より推定した．

有機化合物のポーラログラフによる研究(第3〜4報)
(第3報) バニリン及びイソバニリンのポーラログラフィー：

佐藤　寿：分析化学，6，164 (1957)．

第1報と略同様な方法でバニリンとイソバニリンのポーラログラフィーを行つた結果，両化合物とも0.25M の塩化アンモニウムを支持電解質とした場合の pH −半波電位，波高，還元電子数等との関係について検討し，濃度0.1〜1.0mMで定量出来ることを述べた後，両化合物の還元機構の推定を行つた．

(第4報) 酢酸フェニル水銀のポーラログラフィー：同上，166 (1957)．第3報と同様な操作で本化合物のポーラログラフィーを行つた結果，本化合物は常に2段波を与えた．このものの pH −半波電位，波高，還元電子数等との関係について検討し，濃度 0.05〜2.50mMにおいて定量出来ることを述べた後，還元機構の推定を行つた処，Benesch の報告と略一致することを認めた．

腸線の吸収に関する研究（第1報）ウサギ背筋内における馬腸線の抗張力低下

山地幸雄，志波　剛，石関忠一，岩原繁雄，宮坂清次：医学と生物学，40，(3) 87〜90 (昭和31年)

日腸工業会社製のType A及びType C，Size-No. 0の馬腸線を，体重2kg前後のウサギ背筋内に，直径約3cm の輪に縫い込み，筋膜，皮膚はそれぞれ絹糸で縫合閉鎖し，16日間にわたり経日的に取り出して抗張力を測定した．

抗張力の経日的減少は，ウサギの個体差によるためか，2〜3匹のウサギに同じ腸線を縫い込んで同一時間後に摘出測定した値にも相互にかなりの距りがあり，更に多くの動物で実験を重ねなければならない．Type C では 16 日間で抗張力が，はじめの $^1/_2$ 以下とならず，Type A では2日後にはじめの抗張力の$^1/_2$以下となり，11及び16日後では$^1/_4$以下であつた．従つて組織内において，Type AはType Cより早期に抗張力を失うと認められる．Type Aについての実測値がType Cのそれよりも広い範囲に分布していたことは，少なくもと16日間は，Type CはType Aよりも生体内での抗張力が安定で，均質であることを示唆するものであろう．

腸線の吸収に関する研究（第2報）ペプシン溶液中における馬腸線の抗張力低下

岩原繁雄，山地幸雄，志波　剛，石関忠一，宮坂清次：医学と生物学，40,(3) 91～94（昭和31年）

日腸工業会社製馬腸線 Size—No. 0，Boilable の TypeA 及びCにつき，ペプシンを用いてその抗張力の減弱を試験管内で試験した．ペプシンはミクニ製の濃厚粉末で，チロジン法によるとその力価は1g　1.4単位であつた．このペプシンを Walpoleの pH 2.1 N/5酢酸ソーダ塩酸緩衝液に0.2mg/ccの割に溶かし，その酵素液10cc を容れた共栓中試験管に馬腸線 15cm を環に結んで浸し，50°C恒温水槽中に30分～19時間放置後抗張力を測定した．TypeA では作用後30分で抗張力ははじめの 1/2 以下となつたものがあり，2時間で全部1/2以下4.5時間で結び目及び捩りがもどつて測定不能，6時間では切断し，7時間では糸の形を示さない．ペプシンを加えない緩衝液にTypeAを浸した場合は8時間後に 1/2 となり7時間後に 1,000～500g の抗張力がみられた．TypeC にペプシンを作用させると5時間後に 1/2 以下となりそして 11～18 時間後に 500～100gの抗張力がみられた．緩衝液では12時間後に1/2以下となり19時間後に約450gの抗張力がみられた．

ペプシン溶液中では TypeAは30分～1時間後，TypeCは2～3時間後にその抗張力は半減し，pH2.1緩衝液中ではそれぞれ2～3，4～5時間後に抗張力が半減した．生体内での抗張力減少を以上の試験管内実験により推測することは，なお若干の基礎実験を要するが，可能であると考えられる．

赤痢菌内毒素の研究（第1報）Shigella flexneri 2b（K_8）の内毒素について

西村千昭，中村正夫，大渕令子，岩原繁雄，野崎泰彦，日本生化学会関東支部　11月例会講演 J. Biochem. 44（1957），英文投稿

著者等はShigella flexneri 2b（K_8）（疫痢患者より分離した菌株）の菌体内毒素の抽出に90％石炭酸を用いる方法を採用し，好収量（10～12％）でO-抗原作用を有する粗物質を得た．これをアセトンで分画し，その分画について化学分析を行つた結果，有効な Lipopolysaccharide及びLipopolysaccharide-Nucleic Acid複合体の2種を得，これが毒素の本態であることを知つた．更に毒性，抗原性と複合体構成との関連について検討するために，酢酸，アルカリ，トリプシンによる水解を利用して部分分解を行い，毒性及び抗原性を試験した処，複合体構成に与える脂質—ペプチド部分が毒性及び抗原性を発現するのに必要な因子であり，多糖類部分は種属特異性を左右する因子であることが判つた．

赤痢菌内毒素の研究（第2報）Shigella flexneri 2b 内毒素の精製と免疫血清の沪紙電気泳動

西村千昭，中村正夫，大渕令子，野崎泰彦

第10回日本薬学大会講演

著者等は前報で報告したShigella flexneri 2b（K_8）の内毒素の本態は Lipopolysaccharide（LPS）及びLipopolysaccharide-Nucleic Acid（LPSN）複合体であることを報告したが，これらの中，LPS分画についてその化学的，免疫学的均一性について検討した．前報で電気泳動的に均質と思われたLPS分画は燐酸カルシウムゲルによるクロマトグラフィーを行つた結果，更に三つの含糖類分画に分れ，粗毒素免疫血清について沈降反応を行つたところ，一成分（全体の60～70％）にのみ抗原性を認めた．著者等は更にLPS分画の免疫学的均一性について検討するために Ouchterlonyの寒天拡散法を行つた結果，粗毒素は一つの完全抗原と二つのハプテンよりなり，精製毒素は免疫学的には均一な完全抗原であることを知つた．

CPS分画を注射して得た免疫血清ではγ-グロブリンが増加し，沪紙上で抗原と抗血清を同時にスポットして沪紙電気泳動を行うとγ-グロブリン部の蛋白像が著しく攪乱される．免疫血清のγ-グロブリン分画中の約27％は抗体グロブリンである．

パラ大腸菌に関する研究

八田貞義，山地幸雄，田中弘子，志波　剛，石関忠一：第29回日本細菌学会総会講演要旨（昭和31.4.4.）於熊本

われわれは食品関係，健康人大便，伝染性下痢症患者大便，食中毒患者吐物より E. freundii 及びその近縁菌（H_2S+，またはIMViC—+—+で他の属に入らないもの）120株を得，Arizonaは得られなかつた．これらのうち116株をWest 及び Edwards の Bethesda-Ballerup group標準菌血清により検し，36株に標準菌O抗原，13株に標準菌H抗原を認めた．71株につきLysine，Arginine，Ornithine，Glutamic acid 分解を Møller の法により検し，E. freundii には 37°C で Glutamic acid Decarboxylation 陽性のものを認めなかつた．E. freundii 近縁菌にはアミノ酸分解，標準菌血清による凝集反応で，E. freundii に一致するものとしないものとがあつた．壊疽性，溶血性の間には一定の関係はみられなかつた．標準菌血清に凝集しない E. freundii 3株のO血清に凝集する株はそれぞれ4，

6, 12株あつた．Bethesda-Ballerup属の病原性は，あるとしても極めて弱く，人では個体の抵抗の弱まつたとき胃腸症状を惹起すると考えられている．われわれの成績では．E. freundii 検出率が食品関係では約4％，人の大便では約9％で，これら陽性例は食中毒，下痢などとは直接関係がなかつた．

好塩菌に関する研究

八田貞義，山地幸雄，小嶋秩夫，志波　剛，石関忠一：第30回日本細菌学会総会講演要旨（昭32. 4. 8.）於千葉

昭和30年滝川氏により食中毒より分離された病原性好塩細菌N4株及び昭和25年藤野教授により「シラス」食中毒より分離されたEB102株につき実験を行い次の結論を得た．(1) これら両株は形態，生物学的性状よりPseudomonas あるいはVibrioと考えられる．(2) N4株の発育至適食塩濃度は0.2～1.2モル濃度で，EB102株のそれは0.2～1.0モル濃度である．(3) 両菌株は（20％以上の稀釈海水）＞（5～18％の$MgSO_4$溶液）＞（食塩水）の順で生存日数の延長が認められる．(4)両菌株に対し陰イオンではNaイオンの存在においてCl′＞Br＞SO_4″＞NO_3″＞I′，陽イオンではClイオンの存在においてNa·＞Mg··＞K·の順に発育に有利に作用し，又SO_4″の存在においてはMg··はNa·より菌の発育に有利に作用する．(5) NaClにおいてはNa·よりCl′の方がこれらの菌株の発育に強く要求される．(6)これらの菌株の発育には特に発育素は必要でない．(7)両菌株は有機炭素源のない培地において有機窒素源を発育のために要求するが，アミノ酸要求は甚だ低い．(8) 3％食塩加ペプトン水培養0.5ccまたは3％食塩加ペプトン寒天培養菌1mg腹腔注射により，N4株は確実にマウスを1日以内に斃すが，それぞれ0.05cc，0.1mgではマウスは斃死しない．栄養の少ない培地の培養菌 1mgではマウスは斃死しないことがある．N4株の培養沪液，あるいは100°C 30分加熱死菌はマウスを斃さない．3％食塩加ペプトン水培養5cc腹腔接種により，N4株はマウスを斃すが，EB102株は斃さない．

黴の免疫学的研究（第2報）Penicillium 培養沪液による Shwartzman 現象並び Anaphylaxie について

八田貞義*，中村正夫，上山栄一*：第29回日本細菌学会総会講演（1956. 4. 6.）

Penicillium属，特に病変米黴，P. islandicumの培養沪液，煮沸法による菌体抽出液．Bivin 法及びPalmer法によと抽出した菌体多糖類等を用いてShwartzman現象を観察した．以上のもので準備注射を行い．惹起注射として大腸菌多糖類を用いた場合，70～100日培養の沪液2.0ml及び多糖類10mgの濃度において陽性を示したが，煮沸抽出液では陰性であつた．次に大腸菌多糖類をもつて準備注射を行い，惹起注射として黴培養沪液5ml/kgを用いた場合には陽性を示したが，準備惹起両者とも黴沪液を用いた場合は陰性であつた．

大腸菌多糖類準備注射1時間後に黴培養沪液を注射し，24時間後，型の如く大腸菌多糖類によるSh現象を観察すると，反応が抑制或いは減弱される．すなわちGross-緒方の抑制効果がみられた．

更に24種のPenicillium 属培養沪液によるSh現象ではP. rugulosumに準備能力，P. notatum，P. digitatum，P. rugulosum，P. psitacinum，P. luteoviride，P. puberlum等に惹起能力を認めた．

モルモットについて，受身感作によるAnaphylaxieを行つた結果，黴菌体浮游液250mg，及び多糖類10mgの静脈内注射により定型的なショック症状を示して死亡した．

ケナガコナダニの防除について

宮島弘衛；第1回日本応用動物昆虫学会大会講演（昭和32年3月）

このダニはほとんどの食品につくが，われわれの見た範囲では米及び他の穀類，みそ，粉乳類，類糠，漬物類，酵母剤，チーズ，チョコレート，ビスケットなどの菓子類，畳，砂糖などに発見される．このダニの防除については，高温度，低温度及び天敵によるものが報告されているが，薬品による防除についてはあまり報告がないので演者は次の如き薬品について防除効果を検討した．

炭酸，燐酸の塩類，安息香酸類，ビタミンK_3，ニトロフラゾーンなど食品衛生法で防腐の目的で食品に添加することが許可されている薬品，及びクレゾール石鹸液，臭化メチルなどの防除効果について実験した．また各薬品の効力を仮死状態に至る時間によつて判定し，これら薬品の効力の比較を行い，また種々の濃度のクレゾール石鹸液に対するダニの性別影響を調べてある程度の知見を得た．

* 日本医科大学衛生学教室

国立衛生試験所の標準品について

総　務　課

国立衛生試験所で製造する標準品は，昭和27年6月17日厚生省告示第133号によつて，国立衛生試験所標準品交付規程が布公され同年10月28日同告示第290号によつて，標準品の代金が定められてインシュリン標準品等19品目の製造及び交付を始めその後，昭和32年3月30日厚生省告示第63号によつて血清性性腺刺戟ホルモン標準品等11品目を追加，ビタミンD標準品が削除され，旧品目の一部について価格を改正して今日に及んでいる．

現在当所で製造，交付している標準品は別表のとおり29品目となつている．

国立衛生試験所製標準品

標準品目	単位	価格	使用目的
		円	
日本薬局方標準品			
1. 安息香酸エストラジオール【新】	20mg入1本	1,400	安息香酸エストラジオール注射液**定量法
2. インシュリン	20mg入1本	1,100	インシュリン*注射液，グロビン，亜鉛注射液**，プロタミン亜鉛インシュリン注射液**定量法，アイソフェンインシュリン注射液(国検)定量法，同アイソフェン試験
3. 肝油（ビタミンA検定用）	1g(10,000単位)×10本	1,300	肝油*，肝油カプセル*，強肝油，強肝油*カプセル ビタミンAカプセル*，ビタミンA*油定量法
4. 血清性性腺刺戟ホルモン（新）	1,000単位入1本	3,700	血清性性腺刺戟ホルモン** 注射用血清性性腺刺戟ホルモン**定量法
5. ジギタリス	1g×3本	1,200	ジギタリス*，ジギタリスチンキ*力価試験
6. ジエチルスチルベストロール【新】	20mg入1本	300	ジエチルスチルベストロール錠**，同注射液**定量法
7. 胎盤性性腺刺戟ホルモン（新）	1,000単位入1本	3,300	胎盤性性腺刺戟ホルモン**，注射用胎盤性性腺刺戟ホルモン**定量法
8. デスオキシコルトン（新）	20mg入1本	1,300	酢酸デスオキシコルトン**確認試験
9. 脳下垂体後葉	10mg×2本	600	脳下垂体後葉注射液*，オキシトシン注射液**純度試験 同定量法，バソプレシン注射液**純度試験，同定量法
10. パラアミノベンゾイルグルタミン酸（新）	500mg入1本	1,100	葉酸**，葉酸錠**，葉酸注射液定量法
11. ビタミンB_6【新】	200mg入1本	1,300	塩酸ピリドキシン**，同注射液**定量法
12. プロピオン酸テストステロン【新】	20mg入1本	900	プロピオン酸テストステロン注射液**定量法
13. ヘパリン（新）	1,200単位入1本	1,300	ヘパリン**，ヘパリン注射液**定量法
14. マレイン酸エルゴメトリン【新】	20mg入1本	1,500	マレイン酸エルゴメトリン**，同錠**，同注射液** 酒石酸エルゴタミン注射液**定量法
15. ルチン（新）	500mg入1本	1,100	ルチン**，同錠**，同注射液**定量法
国立衛生試験所標準品			
16. エストラジオール	20mg入1本	900	エストラジオール製品の確認及び定量法
17. エストロン	20mg入1本	800	エストロン製品の確認及び定量法
18. エピレナミン	20mg入1本	600	エピレナミン製品の定量法
19. 酢酸デスオキシコルトン	20mg入1本	1,200	酢酸デスオキシコルトン製品の定量法

標準品目	単位	価格	使用目的
20. ニコチン酸（新）	500mg入1本	1,000	デカビタミンその他ニコチン酸製品の定量法
21. ニコチン酸アミド（新）	500mg入1本	1,000	デカビタミンその他ニコチン酸アミド製品の定量法
22. 馬鈴薯澱粉（新）	100g入1本	1,200	パンクレアチン，ジァスターゼ澱粉消化力
23. ビタミンB_1	200mg入1本	1,200	デカビタミンその他ビタミンB_1製品の定量法
24. ビタミンB_1液	1mg×10本	400	デカビタミンその他ビタミンB_1製品の定量法
25. ビタミンB_2	200mg入1本	1,200	デカビタミンその他ビタミンB_2製品の定量法
26. ビタミンC	1g入1本	1,000	デカビタミンその他ビタミンC製品の定量法
27. プロゲステロン	10mg入1本	900	プロゲステロン製品の確認及び定量法
28. プロタミン（新）	100mg入1本	1,200	アイソフェンインシュリン注射液（国検）アイソフェン試験
29. 融点測定用（アセトアニリド，アセトフェネチジン；カフェイン，スルファニルアミド，スルファピリジン，ワニリン）	1g×6本	2,500	融点測定用温度計，同装置の補正

（新）……新しく設定されたもの
【新】……以前は国立衛生試験所標準品で新しく日本薬局方標準品となつたもの

* ……日本薬局方
** ……国民医薬品集
（国検）……国家検定基準

国立衛生試験所標準品交付依頼手続要領

1. 国立衛生試験所標準品交付規程に基き，標準品の交付を受けようとする者は当所の指定する別紙様式(一)の標準品交付願書を国立衛生試験所に提出すること．
2. 国立衛生試験所は右の交付願書を提出した者に対して直ちに納入告知書を発行する．
3. 国立衛生試験所において発行した納入告知書を受理した者は日本銀行或は日本銀行代理店へその代金を速かに払込むこと．
4. 国立衛生試験所は，日本銀行或は日本銀行代理店より前項代金払込済の通知書を受けたのち標準品を交付する標準品の交付を受けた者は別紙様式(二)の受領書を国立衛生試験所物品出納官宛提出すること．

別紙様式 (一) （大きさＢ５）

標準品交付願書
一金
但
右の物品頭書の金額にて交付願います
昭和　年　月　日
住所
氏名　㊞
国立衛生試験所物品管理官殿

別紙様式 (二) （大きさＢ５）

受領書
右の物品確に受領しました
昭和　年　月　日
住所
氏名　㊞
国立衛生試験所物品出納官殿

注意 1. 氏名は法人組織の場合は代表者名とすること．

2. 捺印は願書，受領書，納入告知書は凡て同一のものを用いること．

国家検定，国家検査等の試験成績報告

総　　務　　課

昭和31年当所における試験，検査等の状況は次のとおりである．

国家検定については7月16日付グルクロン酸ナトリウム，イソニコチン酸ヒドラゾン等の三品目が追加指定され現在におよんでいる．

取扱件数は昨年同様ブドウ糖注射液が最も多く，次にリンゲル液，イソニアジド等である．

大阪支所においてはイソニアジド，同錠は多く取扱われている．国家検査については，昭和30年と同品目につき脱脂綿，ガーゼ等製造業者で不合格となつた製造業者に対して厚生大臣から検査命令が発せられた．取扱件数中最も多いのは，脱脂綿，ガーゼ，サントニン製剤である．

製品検査については昨年同様過酸化ベンゾイルが多い．

その他特行試験はケシの栽培による麻薬試験が依然として多い．

総取扱件数は年々増加を見，本年は昨年より約8500件を更新し過去の最高記録を示した．

衛生試験所における検査状況　　（昭和31年）

件名		試験機関			合計
		東京	大阪	門司	
国家検定		2,045	317	—	2,362
国家検査		7,790	3,686	—	11,476
製品検査		7,779	3,574	—	11,353
輸出検査	薬品	—	—	—	0
	食品	—	18	4	22
輸入検査	薬品	42	—	—	42
	食品	1,557	1,526	129	3,212
特行試験		809	1,336	—	2,145
特需試験		4	3	—	7
一般依頼試験		905	954	—	1,859
計		20,931	11,414	133	32,478

品名	試験機関	国家															
月別		1			2			3			4			5			
種別		計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計
インシュリン注射液	東京	3	3	0	3	3	0	2	1	1	3	2	1	4	4	0	6
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
プロタミン亜鉛インシュリン注射液	東京	1	1	0	1	1	0	1	1	0	—	—	—	1	1	0	—
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
グロビン亜鉛インシュリン注射液	東京	1	1	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	0	1	—
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
アイソフェンインシュリン注射液	東京	—	—	—	2	2	0	3	3	0	1	1	0	4	4	0	3
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
脳下垂体後葉注射液	東京	4	4	0	—	—	—	4	4	0	3	3	0	3	3	0	4
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ヘキシルレゾルシン丸	東京	3	2	1	1	1	0	3	2	1	2	2	0	4	3	1	2
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
避妊薬 錠剤	東京	5	5	0	3	3	0	4	4	0	3	3	0	2	2	0	3
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
〃 ゼリー剤	東京	8	7	1	13	13	0	18	16	2	22	22	0	17	17	0	13
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
〃 クリーム剤	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
〃 坐剤	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	0	—	—	—	—
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
〃 親水性坐剤	東京	—	—	—	1	1	0	2	2	0	4	4	0	3	3	0	—
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
〃 泡発性坐剤	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
〃 泡発性粉剤	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
〃 液剤	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	0	—
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ブドウ糖注射液	東京	53	52	1	62	61	1	58	58	0	66	65	1	71	71	0	58
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
リンゲル液	東京	16	14	2	28	26	2	26	26	0	26	23	3	35	32	3	30
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ロック液	東京	—	—	—	1	1	0	—	—	—	1	1	0	—	—	—	—
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
転化糖注射液	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
イソニアジド	東京	11	11	0	12	12	0	21	21	0	16	16	0	19	19	0	21
	大阪	12	12	0	17	17	0	17	17	0	21	21	0	16	16	0	17
〃 錠	東京	2	2	0	4	4	0	1	1	0	3	3	0	2	2	0	2
	大阪	7	7	0	11	11	0	12	12	0	8	8	0	12	12	0	17

検　　定　（昭和31年）

6		7			8			9			10			11			12			合計		
合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格
6	0	3	3	0	5	4	1	7	7	0	3	2	1	7	7	0	7	7	0	53	49	4
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	1	1	0	1	1	0	2	2	0	1	1	0	—	—	—	1	1	0	10	10	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	1	1	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	1	1	5	3	2
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	0	4	4	0	4	4	0	3	3	0	3	3	0	3	3	0	3	3	0	33	33	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	0	2	2	0	2	2	0	3	3	0	1	1	0	3	3	0	2	2	0	31	31	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1	1	2	2	0	—	—	—	2	2	0	2	2	0	—	—	—	2	2	0	23	19	4
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	0	3	3	0	3	3	0	3	3	0	3	3	0	4	4	0	3	3	0	39	39	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
13	0	21	17	4	26	26	0	19	19	0	18	18	0	12	12	0	9	9	0	196	189	7
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	3	3	0	2	2	0	3	3	0	3	3	0	4	4	0	2	2	0	27	27	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
58	0	60	57	3	52	51	1	62	61	1	73	70	3	42	42	0	43	43	0	700	689	11
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
24	6	36	33	3	32	31	1	23	22	1	30	28	2	24	24	0	22	22	0	328	305	23
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	2	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
21	0	22	22	0	22	22	0	18	18	0	11	11	0	17	17	0	20	20	0	210	210	0
17	0	17	17	0	17	17	0	13	13	0	17	17	0	13	13	0	13	13	0	190	190	0
2	0	1	1	0	3	3	0	4	4	0	2	2	0	3	3	0	8	8	0	35	35	0
17	0	11	11	0	9	9	0	13	13	0	5	5	0	10	10	0	9	9	0	124	124	0

品名	試験機関	1 計	1 合格	1 不合格	2 計	2 合格	2 不合格	3 計	3 合格	3 不合格	4 計	4 合格	4 不合格	5 計	5 合格	5 不合格	計
イソニアジド注射液	東京	—	—	—	—	—	—	1	1	0	—	—	—	3	3	0	1
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
イソニアジドメタンスルホン酸ナトリウム	東京	6	6	0	6	6	0	9	9	0	7	7	0	14	14	0	6
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
〃　錠	東京	2	2	0	2	2	0	11	11	0	7	7	0	11	11	0	12
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
チオアセタゾン	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
〃　錠	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
〃　散	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ピラジナミド	東京	5	5	0	12	12	0	1	1	0	5	5	0	1	1	0	4
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
〃　錠	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4-エチルスルホニルベンズアルデヒドチオセミカルバゾン	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
〃　錠	東京	—	—	—	—	—	—	1	1	0	—	—	—	—	—	—	—
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
〃　散	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
グルクロン酸ナトリウムイソニアゾン	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
〃　錠	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
合計	東京	120	115	5	151	148	3	166	162	4	170	165	5	196	191	5	165
	大阪	19	19	0	28	28	0	29	29	0	29	29	0	28	28	0	34

6		7			8			9			10			11			12			合計		
合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格
1	0	1	1	0	3	3	0	—	—	—	3	3	0	4	4	0	3	3	0	19	19	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6	0	5	5	0	3	3	0	12	12	0	12	12	0	6	6	0	6	6	0	92	92	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
12	0	3	3	0	7	7	0	8	8	0	7	7	0	5	5	0	8	8	0	83	83	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	1	1	0	—	—	—	—	—	—	1	1	0	—	—	—	2	2	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	1	1	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	0	4	4	0	8	8	0	14	14	0	6	6	0	9	9	0	14	14	0	83	83	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5	5	0	2	2	0	—	—	—	7	7	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	14	14	0	14	14	0	5	5	0	3	3	0	3	3	0	39	39	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	2	2	0	13	13	0	8	8	0	—	—	—	4	4	0	27	27	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
158	7	171	161	10	192	189	3	210	208	2	196	190	6	149	149	0	162	161	1	2,048	1,997	51
34	0	28	28	0	28	28	0	26	26	0	22	22	0	24	24	0	22	22	0	317	317	0

国　　家

品名	試験機関	1 計	1 合格	1 不合格	2 計	2 合格	2 不合格	3 計	3 合格	3 不合格	4 計	4 合格	4 不合格	5 計	5 合格	5 不合格	計
脱脂綿	東京	358	354	4	435	432	3	719	710	9	600	596	4	666	656	10	762
	大阪	210	182	28	230	216	14	228	218	10	272	266	6	300	288	12	211
ガーゼ	東京	63	61	2	46	44	2	76	76	0	51	49	2	49	49	0	60
	大阪	46	46	0	76	74	2	52	48	4	59	58	1	59	57	2	36
歯科材料	東京	12	12	0	10	10	0	7	7	0	5	5	0	5	5	0	6
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
衛生サック	東京	4	4	0	8	7	1	10	10	0	8	6	2	4	3	1	6
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
注射筒	東京	3	2	1	4	4	0	5	4	1	4	4	0	5	4	1	15
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
注射針	東京	2	2	0	—	—	—	5	5	0	1	1	0	10	10	0	5
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ビタミン B_1 注	東京	4	4	0	—	—	—	9	9	0	3	3	0	2	2	0	—
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ビタミンA.D.製剤	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
マーキロクローム液	東京	2	2	0	5	5	0	—	—	—	2	2	0	3	3	0	1
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
イクタモール	東京	1	1	0	1	1	0	—	—	—	1	1	0	3	3	0	1
	大阪	1	1	0	—	—	—	3	1	2	3	2	1	1	1	0	3
サントニン製剤	東京	17	17	0	28	28	0	26	26	0	32	32	0	21	21	0	35
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
アルコール	東京	5	5	0	6	6	0	4	4	0	3	3	0	2	2	0	3
	大阪	1	0	1	—	—	—	1	0	1	—	—	—	—	—	—	—
純アルコール	東京	1	1	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
消毒用アルコール	東京	6	6	0	4	4	0	3	3	0	3	3	0	3	3	0	3
	大阪	1	1	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
稀ヨードチンキ	東京	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	—	—	—	1
	大阪	—	—	—	1	1	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
公定書外稀ヨードチンキ製剤	東京	4	4	0	1	1	0	3	2	1	3	3	0	2	2	0	1
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ヨードチンキ	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	0	—
歯科用焼石膏	東京	—	—	—	1	1	0	1	1	0	—	—	—	1	1	0	—
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
羊腸線	東京	—	—	—	1	0	1	3	0	3	—	—	—	1	1	0	2
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
縫合糸	東京	—	—	—	—	—	—	2	2	0	—	—	—	2	2	0	1
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
安息香酸ナトリウムカフェン	東京	—	—	—	—	—	—	1	0	1	—	—	—	—	—	—	1
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
クレゾール石鹸液	東京	7	7	0	8	8	0	9	9	0	11	11	0	4	4	0	14
	大阪	1	1	0	1	1	0	2	2	0	1	1	0	4	4	0	2
グリセリン浣腸剤	東京	1	1	0	1	1	0	—	—	—	1	1	0	2	2	0	—
	大阪	16	16	0	16	16	0	13	13	0	16	16	0	5	5	0	6
タンニン酸アルブミン	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	大阪	1	0	1	1	0	1	1	1	0	—	—	—	—	—	—	1
計	東京	491	484	7	560	553	7	884	869	15	729	721	8	785	773	12	917
	大阪	277	247	30	325	308	17	300	283	17	351	343	8	370	356	14	259

試　験　（昭和31年）

6		7			8			9			10			11			12			計		
合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格
758	4	569	560	9	536	530	6	679	671	8	511	509	2	306	304	2	267	266	1	6,408	6,346	62
199	12	287	280	7	274	274	0	215	213	2	286	283	3	236	236	0	290	289	1	3,039	2,944	95
58	2	33	33	0	34	34	0	32	32	0	41	41	0	29	28	1	26	26	0	540	531	9
36	0	51	51	0	46	46	0	42	42	0	43	43	0	59	59	0	24	24	0	593	584	9
6	0	6	6	0	8	8	0	4	4	0	8	8	0	7	7	0	4	4	0	82	82	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	2	7	5	2	5	5	0	12	9	3	9	7	2	55	36	19	42	29	13	170	125	45
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
11	4	4	4	0	6	5	1	2	2	0	19	15	4	—		—	6	6	0	73	61	12
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		—	—		—	—		—
5	0	12	12	0	11	11	0	1	1	0	—		—	—	—	—	1	1	0	48	48	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		—	18	18	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4	4	0	2	1	1	6	5	1
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1	0	3	3	0	4	4	0	3	3	0	1	1	0	1	1	0	—		—	25	25	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1	0	2	2	0	2	2	0	1	1	0	1	1	0	—	—		2	2	0	15	15	0
1	2	3	1	2	6	6	0	1	1	0	3	2	1	—	—	—	1	1	0	25	17	8
35	0	19	19	0	18	18	0	19	19	0	14	14	0	4	4	0	1	1	0	234	234	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	0	8	8	0	8	8	0	8	8	0	9	9	0	6	6	0	5	5	0	67	67	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	0	1	—		—	1	0	1	4	0	4
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	0	9	8	1	8	8	0	9	9	0	7	7	0	6	6	0	5	5	0	66	65	1
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	0	—	—	—	1	1	0	3	3	0
1	0	—	—	—	2	2	0	1	1	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	8	8	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	0
1	0	3	3	0	2	2	0	—	—	—	3	3	0	2	2	0	—	—	—	24	23	1
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1	0	1	1	0	—	—	—	5	5	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		—	—
2	0	2	2	0	2	2	0	3	2	1	—	—	—	1	1	0	2	2	0	17	12	5
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1	0	1	1	0	2	2	0	—	—	—	2	2	0	1	1	0	1	1	0	12	12	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		—
1	0	—	—	—	1	1	0	—	—	—	1	1	0	—	—	—	—	—	—	4	3	1
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
13	1	8	8	0	12	12	0	8	8	0	4	4	0	3	3	0	4	4	0	92	91	1
2	0	1	1	0	4	4	0	1	1	0	2	2	0	1	1	0	—	—	—	20	20	0
—	—	4	4	0	1	1	0	1	1	0	2	2	0	—	—	—	—	—	—	13	13	0
6	0	6	5	1	2	1	1	14	14	0	9	9	0	9	9	0	4	4	0	116	114	2
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0	1	1	1	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	0	1	6	2	4
904	13	690	678	12	662	655	7	783	771	12	633	625	8	426	404	22	368	353	15	7,928	7,790	138
244	15	349	339	10	332	331	1	273	271	2	345	340	5	305	305	0	322	319	3	3,808	3,686	122

製品

品名	試験機関	1 計	1 合格	1 不合格	2 計	2 合格	2 不合格	3 計	3 合格	3 不合格	4 計	4 合格	4 不合格	5 計	5 合格	5 不合格	計
ズルチン	東京	5	5	0	22	22	0	32	32	0	25	25	0	38	38	0	25
	大阪	25	25	0	20	20	0	38	38	0	54	54	0	62	62	0	49
溶性サッカリン	東京	77	77	0	60	60	0	104	104	0	105	105	0	199	199	0	51
	大阪	27	27	0	41	41	0	37	37	0	54	51	3	80	80	0	32
食用色素	東京	74	74	0	84	84	0	64	64	0	121	121	0	93	93	0	69
	大阪	98	98	0	97	96	1	93	91	2	59	57	2	133	133	0	86
繊維グリコール酸ソーダ	東京	14	14	0	20	19	1	17	17	0	42	42	0	68	68	0	160
	大阪	7	7	0	18	18	0	26	25	1	27	26	1	50	50	0	76
過酸化ベンゾイル	東京	283	283	0	377	377	0	344	344	0	424	424	0	407	407	0	449
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ニトロフラゾール	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	大阪	—	—	—	3	3	0	2	2	0	2	2	0	2	2	0	2
〃製剤	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ニトロフリルアクリル酸アミド	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	大阪	—	—	—	3	3	0	1	1	0	2	2	0	2	2	0	6
〃十倍散	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	大阪	—	—	—	5	5	0	8	8	0	10	10	0	10	10	0	23
ニトロフリルアクリル酸ニトロフラゾーン混合十倍散	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	大阪	—	—	—	4	4	0	15	15	0	17	17	0	10	10	0	24
計	東京	453	453	0	563	562	1	561	561	0	717	717	0	805	805	0	754
	大阪	157	157	0	191	190	1	220	217	3	225	219	6	349	349	0	298

検　　　査　　　（昭和31年）

6		7			8			9			10			11			12			計		
合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格
25	0	20	20	0	36	36	0	15	15	0	21	21	0	26	26	0	73	73	0	338	338	0
49	0	68	68	0	53	53	0	37	29	8	75	75	0	53	53	0	85	85	0	619	611	8
51	0	50	50	0	70	70	0	80	80	0	67	67	0	72	72	0	137	137	0	1,072	1,072	0
32	0	44	44	0	52	52	0	17	17	0	27	27	0	44	44	0	58	58	0	513	510	3
69	0	37	37	0	82	82	0	60	60	0	67	67	0	104	104	0	114	114	0	969	969	0
85	1	78	78	0	181	181	0	76	76	0	117	117	0	173	172	1	214	212	2	1,405	1,396	9
160	0	77	77	0	58	58	0	16	16	0	16	16	0	22	22	0	48	48	0	558	557	1
76	0	57	57	0	49	49	0	67	67	0	96	96	0	103	103	0	149	149	0	725	723	2
449	0	446	446	0	490	490	0	445	445	0	373	373	0	387	387	0	417	417	0	4,842	4,842	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	0	2	2	0	2	2	0	2	2	0	8	8	0	—	—	—	5	5	0	30	30	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6	0	4	4	0	3	3	0	1	1	0	3	3	0	3	3	0	6	6	0	34	34	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
23	0	25	25	0	25	25	0	4	4	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	110	110	0
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
24	0	25	25	0	25	25	0	4	4	0	—	—	—	—	—	—	14	14	0	138	138	0
754	0	630	630	0	736	736	0	616	616	0	544	544	0	611	611	0	789	789	0	7,779	7,778	1
297	1	303	303	0	390	390	0	208	200	8	326	326	0	376	375	1	531	529	2	3,574	3,552	22

昭和32年9月25日印刷
昭和32年9月30日発行

東京都世田谷区玉川用賀町2ノ203
著作者　国立衛生試験所

東京都新宿区市ヶ谷本村町15
印刷所　大蔵省印刷局